

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Elisia Graciela da Silva Lopes

Desenvolvimento de uma abordagem de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo para análise de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* formados *in vitro*



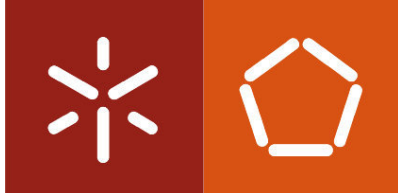
ionização/dessorção a laser assistida por por tempo de voo para análise de biofilmes de

Desenvolvimento de uma abordagem de matriz acoplada a espectrometria de massa *Staphylococcus epidermidis* formados *in vitro*

Elisia Graciela da Silva Lopes

Uminho | 2013

Outubro de 2013



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Elísia Graciela da Silva Lopes

**Desenvolvimento de uma abordagem de
ionização/dessorção a laser assistida por
matriz acoplada a espectrometria de massa
por tempo de voo para análise de biofilmes de
Staphylococcus epidermidis formados *in vitro***

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioengenharia

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Margarida Martins

Outubro de 2013

DECLARAÇÃO

Nome Elísia Graciela da Silva Lopes

Endereço eletrónico pg18765@alunos.uminho.pt **Telefone** 913479084

Número de Identificação Civil 13754277

Título dissertação em PT Desenvolvimento de uma abordagem de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espetrometria de massa por tempo de voo para análise de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* formados *in vitro*

Título dissertação em EN Development of an approach for *in vitro* *Staphylococcus epidermidis* biofilms analysis based on matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry

Orientadora Doutora Margarida Martins

Ano de conclusão 2013

Designação do Mestrado Mestrado em Bioengenharia

Escola de Engenharia, Departamento/Centro Departamento de Engenharia Biológica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura_____

AGRADECIMENTOS

Esta jornada extremamente enriquecedora não seria possível sem a ajuda e a orientação de várias pessoas a quem quero expressar os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar, agradeço à *Doutora Margarida Martins* por todas as horas de constante preocupação, disponibilidade e incentivo quando nem tudo corria bem. Muito obrigada pelos ensinamentos e conselhos, pela paciência e pelos desafios colocados que me fizeram crescer ao longo deste percurso. Agradeço todas as palavras de motivação e apoio que foram essenciais para a conclusão desta dissertação. O meu muito obrigado por tudo....

Agradeço à *Doutora Anabela Rodrigues*, à *Doutora Fernanda Silva*, ao *Doutor José Queirós* e à *enfermeira Olívia Santos* do Centro Hospitalar do Porto- Hospital Geral de Santo António pela cedência dos cateteres de hemodiálise incluídos neste estudo.

À *Micoteca da Universidade do Minho (MUM)* pela disponibilização de material e reagentes para a execução do trabalho experimental.

Agradeço a todos os *colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) 1*, pela ajuda sempre que necessário, em particular à *Joana Sampaio*, que me acompanhou ao longo desta jornada.

Este trabalho foi realizado no LMA 1 do CEB-IBB,UM e foi financiado pelo Projeto de Investigação "*Insights into peritoneal dialysis catheter associated biofilms - Avaliação da contribuição dos biofilmes microbianos para as infeções em diálise peritoneal*", atribuído pela Sociedade Portuguesa de Nefrologia à Doutora Anabela Rodrigues.

E não posso deixar de agradecer aos meus amigos e família por todos os momentos de diversão e constante apoio.

Aos meus amigos desde sempre, *Liliana, Jorge, Diana, Jaca, Pia e Joana* que mesmo à distância, foram um importante apoio neste percurso. Obrigada pelas longas conversas e por estarem sempre disponíveis para mim!

A todos os amigos que conheci ao longo desta caminhada e que foram a minha segunda família. Em especial, à *Bete* pelas palavras de conforto, pela preocupação e pela grande amizade que construímos. Aos meus amigos de mestrado, *Débora, Rui, Pedro, Diana e Alexandra*, que partilharam comigo todos os dias desta jornada, obrigada pela animação durante a nossa “hora do café” e pela constante boa disposição.

Um agradecimento especial ao *Mário* que esteve sempre ao meu lado durante todo este percurso, obrigada por me fazeres rir mesmo nos momentos mais difíceis. Não há palavras que

AGRADECIMENTOS

descrevam o meu agradecimento por todos os bons momentos o teu lado. Obrigada por todo o teu amor e carinho...

A toda a minha *família* que sempre apoiou todas as minhas escolhas e incentivou a superar-me a mim mesma. Aos meus *pais*, pelas palavras de conforto e confiança e ao meu irmão, *Pedro* pelas brincadeiras e diversão! Á minha *mãe* que sempre acreditou em mim mais do que qualquer outra pessoa, que me incentivou a percorrer o meu próprio caminho mas esteve sempre ao meu lado. Obrigada por todos os miminhos e ternura.

Um grande agradecimento à minha *avó*, a minha segunda mãe, que em pequenina me levava todos os dias a escola e sonhava com um grande futuro para mim.

Hoje, esse sonho começa a concretizar-se e sem ela nada teria sido possível...

“A mais bela experiência que podemos ter é a do misterioso. Ele é a emoção fundamental que permanece no berço da verdadeira arte e da verdadeira ciência”

Albert Einstein

Os cateteres são a principal via de acesso venoso em pacientes que realizam hemodiálise (HD). Contudo, estes estão associados a elevadas taxas de mortalidade e morbidade devido principalmente ao desenvolvimento de infeções. De facto, os cateteres facilitam o acesso ao sangue de microrganismos, em particular de *Staphylococcus epidermidis*, que possui a capacidade de aderir às superfícies do cateter e formar biofilme. O processo de formação de biofilme é multifatorial, podendo as proteínas intervenientes representar potenciais biomarcadores para o diagnóstico e monitorização terapêutica de infeções. Por conseguinte, o principal objetivo deste estudo consistiu na caracterização de biofilmes de *S. epidermidis* utilizando ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS). Inicialmente, foi realizada a pesquisa de microrganismos em cateteres de HD e investigada a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de isolados clínicos de *S. epidermidis*. Adicionalmente, foi desenvolvida uma metodologia para a investigação do perfil proteico de sobrenadantes e das frações celulares (células de biofilme e planctónicas) de biofilmes de *S. epidermidis* formados *in vitro*, por MALDI-TOF MS.

Este estudo revelou que a presença de microrganismos não é universal nos cateteres de HD. Contudo, *S. epidermidis* foi recuperado de cateteres e foi demonstrada a sua capacidade de formar biofilme *in vitro*. A análise por MALDI-TOF MS de sobrenadantes de biofilme mostrou que, nas condições testadas, não é possível obter espectros com qualidade, em termos do número de picos e de reprodutibilidade, invalidando a continuidade do seu estudo. Por outro lado, os estudos efetuados com frações celulares revelaram que os melhores espectros de MALDI-TOF MS, com maior número de picos detetados, se obtêm com: (1) a matriz *ferulic acid* (*vs.* a matriz *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*); (2) 2×10^8 UFC/posição da placa de MALDI-TOF MS (num intervalo de 2×10^6 a 6×10^8 UFC/posição); (3) com células intactas (*vs.* extratos celulares) lavadas e ressuspensas em ácido trifluoroacético. Apesar do método de MALDI-TOF MS ser rápido, simples e facilmente aplicável, a baixa reprodutibilidade observada neste estudo não permitiu a determinação de um perfil único, representativo e diferencial para cada fração celular.

Em conclusão, este trabalho permitiu mostrar a importância da otimização de diferentes parâmetros experimentais nas análises de MALDI-TOF MS, sendo no entanto necessário o estudo de diferentes abordagens experimentais para a análise de biofilmes de *S. epidermidis*, antes de qualquer aplicação clínica desta técnica.

Catheters are the most frequently used venous accesses in patients on hemodialysis (HD). However, these are associated with high rates of mortality and morbidity mainly due to the development of infections. In fact, catheters provide the access of microorganisms to the blood, particularly *Staphylococcus epidermidis* that has the ability to adhere to catheters surface and to form biofilms. The biofilm formation is a multifactorial process, and the proteins involved may represent potential biomarkers for diagnosis and therapeutic monitoring of infections. Therefore, the aim of this study was the characterization of *S. epidermidis* biofilms using matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Initially, the microbial population on HD catheters and the ability of clinical isolates of *S. epidermidis* to form biofilms *in vitro* was evaluated. Furthermore, it has been developed a methodology based on MALDI-TOF MS, to investigate the protein profile of supernatants and cellular fractions (biofilm and planktonic cells) of *S. epidermidis* biofilms formed *in vitro*.

In this study, the analysis performed on catheters revealed that the presence of microorganisms is not universal in the HD catheters. However, *S. epidermidis* was recovered from catheters and it was demonstrated their ability to form biofilms *in vitro*. The MALDI-TOF MS analysis for biofilm supernatants showed that, under the tested conditions, it is not possible to obtain spectra with enough quality, regarding the number of peaks and the reproducibility, hampering their study. On the other hand, the studies concerning the cell fractions revealed that the best MALDI-TOF MS spectra, with higher number of peaks, are obtained with: (1) the ferulic acid matrix (*vs.* α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix); (2) 2×10^8 CFU/MALDI-TOF MS plate position (in a range between 2×10^6 and 6×10^8 CFU/position); (3) with intact cells (*vs.* cell extracts) washed and resuspended in trifluoroacetic acid. Although the MALDI-TOF MS method was fast, simple and easily applicable, the low reproducibility observed in this study did not allow the determination of a unique, representative and differential profile for each cell fraction.

In conclusion, this study revealed the importance of the optimization of several experimental parameters in MALDI-TOF MS analysis although it is necessary the study of different approaches for the analysis of *S. epidermidis* biofilms, before any clinical application of this technique.

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
ÍNDICE	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
PREÂMBULO	xxiii
 Capítulo 1 INTRODUÇÃO	 1
1.1. Hemodiálise e infecções associadas a cateteres de hemodiálise	3
1.1.1. Cateteres de hemodiálise	3
1.1.2. Infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres	4
1.2. Patogénese das infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres	5
1.2.1. Recuperação de microrganismos de cateteres	6
1.2.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
1.3. Processo de formação de biofilmes de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
1.3.1. O papel das proteínas na formação do biofilme	11
1.4. MALDI-TOF MS em microbiologia: implicações experimentais	14
1.4.1. Princípio da técnica	16
1.4.2. Preparação da amostra	17
1.4.2.1. Sobrenadantes	17
1.4.2.2. Frações celulares	17
1.4.3. Seleção da matriz	19
1.4.4. Reprodutibilidade	20
1.5. Objetivos	21
 Capítulo 2 MATERIAIS E MÉTODOS	 23
2.1. Meios de cultura	25
2.1.1. <i>Tryptic Soy Broth</i>	25
2.1.4. <i>Eosin Methylene Blue Agar</i>	25
2.1.5. <i>Mannitol Salt Agar</i>	25
2.1.6. <i>Luria - Bertani Agar</i>	26
2.2. Soluções	26
2.2.1. Solução salina	26
2.2.2. Violeta Cristal	26
2.2.3. Matriz <i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i>	26
2.2.4. Matriz <i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>	26
2.2.5. Matriz <i>ferulic acid</i>	27
2.3. Microrganismos	27
2.3.1. Microrganismos	27
2.3.2. Armazenamento e criopreservação dos microrganismos	27
2.4. Pesquisa de microrganismos em cateteres de hemodiálise	27
2.4.1. Pacientes	27

ÍNDICE

2.4.2.	Cateteres de hemodiálise	28
2.4.3.	Recuperação de microrganismos de cateteres de hemodiálise	28
2.4.3.1.	Identificação presuntiva dos microrganismos	28
2.4.3.2.	Identificação definitiva dos microrganismos	28
2.5.	Estudo de biofilmes de <i>Staphylococcus epidermidis</i> formados <i>in vitro</i>	29
2.5.1.	Condições de cultura	29
2.5.2.	Revestimento dos poços da placa de 96 poços	29
2.5.3.	Formação de biofilme	30
2.5.3.1.	Determinação do número de células cultiváveis	30
2.5.3.2.	Determinação da biomassa total	31
2.5.4.	Análise dos dados	31
2.6.	Investigação do perfil MALDI-TOF MS de sobrenadantes e frações celulares de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> formado <i>in vitro</i>	31
2.6.1.	Preparação da amostra	32
2.6.1.1.	Sobrenadantes	32
2.6.1.2.	Frações celulares	33
2.6.2.	Análise de MALDI-TOF-MS	34
2.6.3.	Análise dos dados	34
2.6.3.1.	Análise da reprodutibilidade	35
2.6.3.2.	Análise de <i>Clustering</i>	36
Capítulo 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO		37
3.1.	Semiquantificação e identificação de microrganismos em cateteres de hemodiálise	39
3.2.	Estudo de biofilmes de <i>Staphylococcus epidermidis</i> formados <i>in vitro</i>	40
3.2.1.	Capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i>	41
3.2.2.	Células planctónicas	42
3.3.	Investigação do perfil de MALDI-TOF MS de frações celulares e sobrenadantes de biofilmes de <i>Staphylococcus epidermidis</i> formados <i>in vitro</i>	43
3.3.1.1.	Seleção da matriz e da quantidade de amostra	44
3.3.1.2.	Preparação das frações celulares	50
3.3.1.3.	Lavagem das frações celulares	51
3.3.2.	Intervalo m/z entre 700 e 3000	53
3.3.3.	Recomendações experimentais	55
3.3.4.	Reprodutibilidade da metodologia otimizada	55
Capítulo 4 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHOS FUTUROS		61
Capítulo 5 REFERÊNCIAS		65
ANEXO		76

Figura 1: Cateter de HD evidenciando os diferentes segmentos que o compõem	4
Figura 2: Potenciais vias de entrada dos microrganismos no cateter de HD	5
Figura 3: Modelo proposto para a formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i> que inclui as fases de (A) adesão, (B) agregação e acumulação, (C) maturação e (D) dispersão (adaptado de Otto, 2009).	10
Figura 4: Esquema da técnica MALDI-TOF MS (adaptado de Croxatto <i>et al.</i> , 2012).	16
Figura 5: Fluxograma relativo à recolha da amostra e às etapas de otimização de MALDI-TOF MS de sobrenadantes e frações celulares de biofilme de <i>S. epidermidis</i> formado in vitro. .	32
Figura 6: Número de células cultiváveis recuperadas a partir de biofilmes de <i>S. epidermidis</i> . Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes, com oito réplicas dependentes, e as barras de erro representam o desvio padrão (DP) em relação à média. O controlo de remoção de biofilme (item 2.5.3.2.) mostrou que mais de 90% do biofilme foi removido com o método utilizado.	41
Figura 7: Biomassa de biofilme de <i>S. epidermidis</i> , expressa em função da D.O. 570 nm de violeta cristal/ 10^{-7} UFC. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes, com oito réplicas dependentes, e as barras de erro representam o DP em relação à média.	42
Figura 8: Número de células planctónicas cultiváveis de <i>S. epidermidis</i> . Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes, com oito réplicas dependentes, e as barras de erro representam o DP em relação à média.	43
Figura 9: Espetros de MALDI-TOF MS obtidos para sobrenadantes de biofilme de <i>S. epidermidis</i> . Cada amostra foi analisada com a matriz (A) CHCA e (B) FA, utilizando diferentes quantidades de proteína: (a) 2, (b) 1, (c) 0,5 e (d) 0,1 µg. Os picos identificados no espetro são inferiores ao <i>Threshold Apex Peak Detection</i> (offset: 0,015 mV; response: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000.	45
Figura 10: Imagens de duas posições da placa de MALDI-TOF MS e dos espetros correspondentes obtidos com uma mesma amostra de proteína obtida a partir de sobrenadante de biofilme de <i>S. epidermidis</i> . Exemplo de imagem de co-cristalização com elevada (A) e baixa (B) qualidade e espetro MALDI-TOF MS correspondente. Cada amostra foi analisada com a matriz FA e 1 µg de proteína. Os picos identificados no espetro são inferiores ao <i>Threshold Apex Peak Detection</i> (offset: 0,015 mV; response: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 11:** Espectros de MALDI-TOF MS obtidos para células intactas de biofilme de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz (A) CHCA e (B) FA utilizando diferentes números de células: (a) 6×10^8 , (b) 2×10^8 , (c) 2×10^7 e (d) 2×10^6 UFC/posição. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000. **48**
- Figura 12:** Espectros de MALDI-TOF MS obtidos para células planctônicas de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz (A) CHCA e (B) FA, com diferentes números de células: (a) 6×10^8 , (b) 2×10^8 , (c) 2×10^7 e (d) 2×10^6 UFC/posição. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200) Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000. **49**
- Figura 13:** Espectros MALDI-TOF MS de extratos celulares de (A) biofilme e (B) planctônicas de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz FA com 2×10^8 UFC iniciais. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200) Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000. Contrapor com as Figuras 11 e 12. **51**
- Figura 14:** Espectros MALDI-TOF MS de células de (A) biofilme e (B) planctônicas não lavadas com TFA, de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz FA e com número de células correspondente a 2×10^8 UFC/posição. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000. Contrapor com as Figuras 11 e 12. **52**
- Figura 15:** Espectros de MALDI-TOF MS do sobrenadante da resultante da lavagem com 0,1% de TFA de células de (A) biofilme e (B) planctônicas de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz FA. Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000. **53**
- Figura 16:** Espectros MALDI-TOF MS de células de (A) biofilme e (B) planctônicas de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz FA e com número de células correspondente a 2×10^8 UFC/posição. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 700 e 3000. **54**

Figura 17: *Clustering* hierárquico das listas de picos geradas por MALDI-TOF MS, no intervalo de m/z entre 700 e 7000, de células de biofilme (B) e planctónicas (P) de *S. epidermidis*, relativo a três experiências (i a iii), cada uma com quatro réplicas (1 a 4). O dendrograma foi construído utilizando o *software* SPECLUST, os parâmetros métrica, distância de ligação e distância de similaridade foram definidos como correlação, média e 1 Da, respetivamente. A escala utilizada no dendrograma representa a distância entre cada lista de picos.....**57**

Figura 18: *Clustering* hierárquico das três listas geradas através da média das listas de picos encontrados em pelo menos três das quatro listas associadas a cada experiência, no intervalo de valores m/z entre 700 e 7000, de células de biofilme (B) e planctónicas (P), de *S. epidermidis*, relativo a três experiências (i a iii). O dendrograma foi construído utilizando o *software* SPECLUST, os parâmetros métrica, distância de ligação e distância de similaridade foram definidos como correlação, média e 1 Da, respetivamente. A escala utilizada no dendrograma representa a distância entre cada lista de picos.....**58**

Tabela 1: Sumário de estudos de recuperação e identificação de microrganismos de cateteres de HD.....	7
Tabela 2: Sumário das proteínas descritas na formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i>	12
Tabela 3: Exemplos de potenciais aplicações, com ênfase particular em microbiologia, da técnica de MALDI-TOF MS.....	15
Tabela 4: Algumas das matrizes frequentemente utilizadas na análise MALDI-TOF MS e as suas aplicações.....	20
Tabela 5: Densidade e identificação dos microrganismos isolados de cateteres de HD	40
Tabela 6: Reprodutibilidade intra-réplicas. Picos perfeitamente reprodutíveis correspondem àqueles encontrados em quatro das quatro listas de picos geradas em cada experiência (i a iii). Picos reprodutíveis correspondem àqueles encontrados em pelo menos três das quatro listas de picos geradas em cada experiência (i a iii)	56
Tabela 7: Valores m/z específicos de células de biofilme e planctônicas de <i>S. epidermidis</i>	59

Aae:	<i>Autolysin/adhesin from Staphylococcus epidermidis</i>
Aap:	<i>Accumulation associated protein</i>
AtlE:	<i>Autolysin from Staphylococcus epidermidis</i>
Bap:	<i>Biofilme-associated protein homolog</i>
BHI:	<i>Brain heart infusion</i>
CHCA:	<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
CNS:	<i>Coagulase-negative Staphylococcus</i>
CRBSI:	<i>Catheter-related bloodstream infections</i>
D.O.:	Densidade ótica
DHAP:	<i>Dihydroxy-acetophenone</i>
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP:	Desvio padrão
EMB:	<i>Eosin methylene blue</i>
Embp:	<i>Extracellular matrix binding protein</i>
FA:	<i>Ferulic acid</i>
GehD:	<i>Glycerol ester hydrolase D</i>
GluSE:	<i>Glutamyl endopeptidase from Staphylococcus epidermidis</i>
HD:	<i>Hemodiálise</i>
HPLC:	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
LB:	<i>Luria-Bertani</i>
m/z:	<i>mass/charge</i>
MALDI-TOF MS:	<i>ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo</i>
MAS:	<i>Mannitol salt agar</i>
MW:	<i>Molecular weight</i>
PSMs:	<i>Phenol-soluble modulins</i>
RNA:	<i>Ribonucleic acid</i>
SA:	<i>Sinapinic acid</i>
SdrF:	<i>Serine-aspartate repeat containing protein F</i>
SdrG:	<i>Serine-aspartate repeat containing protein G</i>
SepP1:	<i>Staphylococcus epidermidis protease 1</i>
SSP:	<i>Staphylococcal surface protein</i>
TCA:	<i>Trichloroacetic acid</i>
TFA:	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TSA:	<i>Tryptic soy agar</i>
TSB:	<i>Tryptic soy broth</i>
UFC:	<i>Unidade formadora de colônias</i>

A hemodiálise (HD) é a terapia dialítica mais frequentemente adotada a nível mundial como terapia de substituição renal. O acesso venoso é efetuado principalmente através de cateter. Apesar dos desenvolvimentos técnicos e terapêuticos, o cateter continua a estar associado ao desenvolvimento de infeções que estão associadas a elevadas despesas em cuidados de saúde, ao aumento do tempo de hospitalização dos doentes e podem resultar em morte.

Assim, a prevista diminuição da natalidade e o crescente envelhecimento da população, em paralelo com o aumento da incidência de obesidade, diabetes e hipertensão, antecipam o aumento do número de doentes renais crónicos nos próximos anos. Com isto prevê-se que ocorra uma expansão da utilização de HD, o que resulta na urgência da descoberta de novos métodos de diagnóstico e monitorização terapêutica de infeções. Apesar de se sugerir que o biofilme, nomeadamente de *Staphylococcus epidermidis*, está associado ao desenvolvimento de infeções em cateteres de HD, o conhecimento sobre os fatores que influenciam as infeções associadas a biofilme são ainda pouco compreendidos. No entanto, a presença de biofilme em cateteres pode representar um desafio à prática clínica nomeadamente pelas implicações terapêuticas, devido ao aumento da tolerância aos antimicrobianos e à possibilidade de complicações clínicas secundárias.

Apesar de a informação sobre as proteínas associadas ao biofilme de *S. epidermidis* ser muito escassa o seu estudo pode abrir a possibilidade de descoberta de novas estratégias de diagnóstico, profilaxia e/ou tratamento de infeções. A técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espetrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) é altamente promissora para o estudo de proteínas porque possibilita uma análise rápida e fácil, permitindo traçar perfis para deteção de biomarcadores, nomeadamente associados a infeções.

A presente dissertação está organizada em cinco capítulos. O *capítulo 1* inclui os conceitos teóricos mais relevantes sobre as infeções associadas a cateteres de HD, os biofilmes de *S. epidermidis*, com ênfase particular nas proteínas intervenientes na sua formação, e a técnica de MALDI-TOF MS, nomeadamente as suas principais implicações

PREÂMBULO

metodológicas. No *capítulo 2* são descritos os materiais e métodos utilizados para execução do trabalho experimental. No *capítulo 3* são apresentados e discutidos os resultados relativos à recuperação e isolamento de microrganismos de cateteres de HD, ao estudo de biofilmes de *S. epidermidis* formado *in vitro* e à otimização da análise de perfis de MALDI-TOF MS de sobrenadantes e frações celulares de biofilmes de *S. epidermidis*. No *capítulo 4* são indicadas as principais conclusões resultantes deste estudo e são apontadas algumas sugestões para a realização de futuros trabalhos de investigação. No *capítulo 5* são apresentadas as referências bibliográficas consultadas no âmbito do desenvolvimento desta dissertação.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1. Hemodiálise e infeções associadas a cateteres de hemodiálise

As terapias de substituição renal adotadas no tratamento de insuficiência renal crónica (estadio 5) incluem a hemodiálise (HD), a diálise peritoneal e o transplante renal. De acordo com os dados mais atuais, recolhidos pelo *United States Renal Data System*, a nível global 93% destes pacientes são tratados recorrendo a HD (U.S. Renal Data System, 2013). De igual modo, em Portugal, no ano de 2011, 90% dos 2391 pacientes que iniciaram tratamento de terapia de substituição renal foram tratados com HD (Macário, 2012), evidenciando a relevância desta modalidade dialítica no tratamento da insuficiência renal crónica.

No processo de HD o sangue do paciente é removido através de um acesso venoso e filtrado artificialmente num dispositivo externo, o dialisador. Durante este processo a água e resíduos metabólicos de baixo peso molecular atravessam uma membrana semipermeável por mecanismos de difusão e ultrafiltração (Daugirdas *et al.*, 2000). O tratamento tem a duração de 3 a 4 h, sendo repetido duas a três vezes por semana (Briefel, 2006), o que limita a qualidade de vida e bem-estar do paciente.

1.1.1. Cateteres de hemodiálise

Nos pacientes tratados com HD o acesso venoso permanente é efetuado através de fistulas arteriovenosas, de enxertos arteriovenosos ou de cateteres venosos centrais (Figura 1), que passarão a ser referidos como cateteres (Gunatillake *et al.*, 2011). A escolha do tipo de acesso vascular depende do estado de saúde do paciente e das suas necessidades clínicas (Besarab *et al.*, 2006). No entanto, os cateteres são a via de acesso mais frequentemente utilizada. Especificamente, em Portugal dos 2136 pacientes que iniciaram HD em 2011, em 57,2% foi colocado um cateter (Macário, 2012).

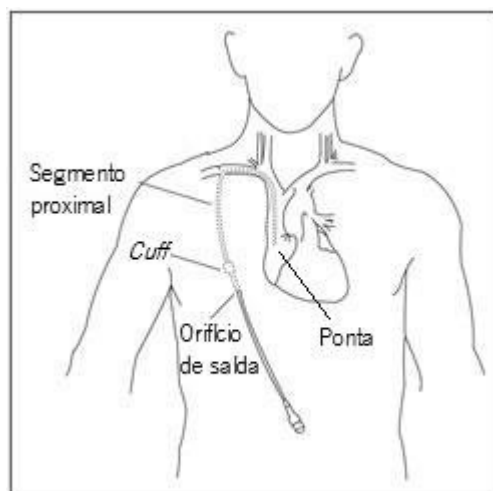


Figura 1: Cateter de HD evidenciando os diferentes segmentos que o compõem
[adaptado de <http://upmc.com/patients-visitors/education/PublishingImages/A-C/CVC-image201.jpg>
(acedido em 04.09.2013)].

1.1.2. Infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres

Os cateteres de HD estão associados a taxas de mortalidade e morbidade elevadas em comparação com os restantes acessos permanentes (Pastan *et al.*, 2002), devido principalmente às complicações infecciosas associadas ao cateter, que se desenvolvem ao nível do orifício de saída (Figura 1) ou túnel e da corrente sanguínea (Nassar & Ayus, 2001; Wilcox, 2009). As infecções do orifício de saída/túnel definem-se clinicamente pela presença de eritema, endurecimento e/ou sensibilidade no espaço de 2 cm junto ao orifício de saída/túnel e podem estar associadas a outros sintomas de infeção, tais como febre ou pus emergentes do orifício de saída, com ou sem a presença de infeção da corrente sanguínea. As infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres (CRBSI; do inglês *catheter-related bloodstream infections*) são definidas clinicamente como bacteriemia ou fungemia em pacientes que apresentam, pelo menos, uma cultura de sangue positiva, obtida através de uma veia periférica, em paralelo com manifestações clínicas de infeção (febre, calafrios e hipotensão) e sem aparente fonte de infeção, com exceção para o cateter (Mermel *et al.*, 2001). Adicionalmente, associadas às CRBSI, têm sido descritas complicações secundárias tais como endocardite, osteomielite, artrite séptica e embolia pulmonar. Estas complicações estão associadas ao aumento do período de hospitalização e da taxa de mortalidade entre os pacientes de HD (Saxena *et al.*, 2005).

1.2. Patogénese das infeções da corrente sanguínea associadas a cateteres

O processo de patogénese das CRBSI é complexo e multifatorial, tendo vindo a ser reportados fatores relacionados com o paciente, os procedimentos inerentes à realização da diálise, o cateter e os microrganismos. Em particular no que respeita ao paciente, o risco de desenvolvimento de CRBSI parece estar associado à idade avançada (Powe *et al.*, 1999) e/ou ao comprometimento do sistema imunitário (Jaber, 2005) e/ou a historial clínico de diabetes (Allon, 2004). O procedimento de HD pode também estar envolvido no aumento do risco de infeção através da contaminação microbiana do equipamento, dos fluidos administrados ao longo do cateter, do inadequado tratamento da água e da reutilização do dialisador (Jaber, 2005; Powe *et al.*, 1999). Por outro lado, o cateter pode também estar envolvido na patogénese das CRBSI atuando como porta de acesso dos microrganismos à corrente sanguínea do paciente (Jaber, 2005). Com efeito, os microrganismos podem entrar no cateter de HD através de uma de três vias (Figura 2): (A) migração percutânea dos microrganismos presentes na flora da pele do paciente ou dos profissionais de saúde, aquando da implantação do cateter ou nos dias seguintes, (B) contaminação do conetor durante a inserção do cateter ou no momento da sua manutenção, ou (C) contaminação hematogénica com microrganismos provenientes de infeções em outros locais (Crnich & Maki, 2002).

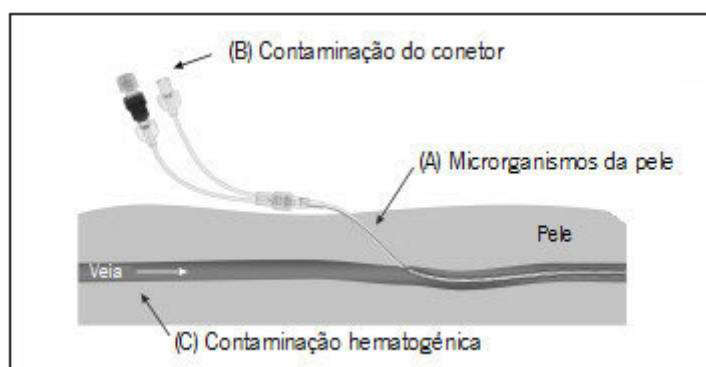


Figura 2: Potenciais vias de entrada dos microrganismos no cateter de HD

[adaptado de <http://origin-ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0095510808000857-gr1.jpg> (acedido em 18.08.2013)].

1.2.1. Recuperação de microrganismos de cateteres

O diagnóstico clínico das CRBSI acima mencionado (item 1.1.2.) é uma abordagem pouco específica. Por outro lado, o diagnóstico laboratorial das CRBSI baseado na cultura da ponta do cateter apresenta maior precisão, embora seja discutível uma vez que só pode ser efetuado removendo o cateter (Mermel *et al.*, 2001). Os métodos laboratoriais recomendados pela *European Renal Best Practice* (Vanholder *et al.*, 2010) incluem o método semiquantitativo de rolamento em placa da ponta do cateter (Maki *et al.*, 1977) e os métodos quantitativos de sonicação (Sherertz *et al.*, 1990) e de lavagem intraluminal (Kite *et al.*, 1997). A presença de infecção é indicada por um valor superior a 15 unidades formadoras de colónias (UFC) (método semiquantitativo) ou a 10^2 UFC (métodos quantitativos) (Mermel *et al.*, 2001).

O método mais frequentemente adotado é rolamento em placa da ponta do cateter, principalmente em cateteres colocados durante curtos períodos de tempo (< 1 semana). Nestes cateteres a entrada dos microrganismos parece ocorrer preferencialmente através da migração percutânea dos microrganismos da pele (Figura 2A), colonizando a superfície extraluminal do cateter. No caso de cateteres colocados durante longos períodos de tempo (> 1 semana) a entrada de microrganismos parece ocorrer principalmente através da contaminação do conector (Figura 2B), ocorrendo a consequente colonização da superfície intraluminal do cateter. Neste caso, o método de rolamento em placa do cateter pode ser menos sensível e são recomendados os métodos quantitativos (Mermel *et al.*, 2001; Vanholder *et al.*, 2010).

No entanto, a seleção de um método laboratorial para a análise dos cateteres não é consensual. Como se evidencia na Tabela 1, na literatura são utilizados diferentes métodos para recuperação de microrganismos e além da ponta do cateter são processados outros segmentos. Por exemplo, Kite *et al.* (1997) (Tabela 1) utilizou três metodologias diferentes: rolamento em placa, lavagem intraluminal e vortex, para a análise de dois segmentos do cateter: ponta e segmento proximal e foi demonstrado que a colonização é superior na superfície extraluminal em relação à superfície intraluminal. No estudo de Guembe *et al.* (2012) (Tabela 1) foram utilizadas duas metodologias: rolamento em placa e sonicação para a análise da ponta do cateter e foi observado que o rolamento em placa da ponta do cateter é a melhor abordagem para a recuperação de microrganismos de cateteres de HD colocados durante longos períodos de

Tabela 1: Sumário de estudos de recuperação e identificação de microrganismos de cateteres de HD

Método de recuperação microbiana	Elementos analisados	Cateteres (n ^a)	Incidência de colonização (%)	CRBSI (n ^a)	Distribuição dos microrganismos isolados (%)							Referência
					Gram-positivos			Gram-negativos			Fungos	
					<i>S. aureus</i>	CNS	Outros	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Enterobacter spp</i>	Outros		
Rolamento em placa	Ponta do cateter	780	19,4	14	13,6	25	2,8	11,4	10,2	22,7	7,9	(Collignon et al., 1986)
Rolamento em placa; Cultura em meio líquido	Ponta e segmento proximal do cateter	502	9	58	5	28 ^a	40,5	6,5	7	9	4	(Haslett et al., 1988)
Rolamento em placa; Sonicação	Ponta e segmento proximal do cateter	359	8	11	10,8	61 ^a	10,8	0	0	3,6	14,4	(Raad et al., 1993)
Rolamento em placa; Vortex	Ponta do cateter	623	8	11	13,7	79,2	5,3	0	2	4	5,9	(Moro et al., 1994)
Rolamento em placa; Lavagem intraluminal; Vortex	Ponta e segmento proximal do cateter	230	33	22	7	63	7	0	0	1	1	(Kite et al., 1997)
Rolamento em placa; Lavagem intraluminal; Sonicação	Ponta e segmento proximal do cateter	1154	†	†	13,1	48,6	3,6	6,3	0,5	11,7	19,4	(Donelli et al., 2001)
Rolamento em placa; Lavagem intraluminal	Ponta do cateter	232	36	25	12,5	21,3	0	17,5	0	38,8	10	(Parameswaran et al., 2011)
Rolamento em placa; Sonicação	Ponta do cateter	149	26,2	11	12,5	43,7	14,6	2,1	4,2	14,5	8,3	(Guembe et al., 2012)

^a este valor refere-se exclusivamente a *S. epidermidis*; †, valor não mencionado; CNS: *coagulase-negative Staphylococcus*

tempo, contrariamente ao preconizado pela *European Renal Best Practice* (Vanholder *et al.*, 2010).

Apesar de os métodos utilizados nos estudos sumariados na Tabela 1 não serem uniformizados em termos metodológicos, estes permitem a identificação da população microbiana presente nos cateteres. De notar que, apesar de existirem vários estudos em que é efetuada a recuperação de microrganismos dos cateteres de HD (revisto em Safdar *et al.*, 2005), são poucos os estudos detalhados em que é efetuada a identificação concomitante dos microrganismos. Os estudos sumariados na Tabela 1, revelam que as bactérias Gram-negativas representam apenas cerca de 9% dos microrganismos recuperados, sendo *Pseudomonas aeruginosa* um dos microrganismos mais frequentemente isolado (Tabela 1). De igual forma, os fungos representam uma pequena percentagem da população microbiana presente nos cateteres, aproximadamente 8% (Tabela 1). Por outro lado, as bactérias Gram-positivas representam mais de 80% dos microrganismos recuperados, das quais 11% são *Staphylococcus aureus* (Tabela 1). De facto, os principais microrganismos isolados de cateteres são bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas (CNS; do inglês *coagulase-negative Staphylococcus*) (Tabela 1), especificamente *Staphylococcus epidermidis*. Em particular, Moro *et al.* (1994) mostrou que 79,2% dos microrganismos recuperados são CNS, sendo que destes 43,1% são *S. epidermidis*. De igual modo, no estudo desenvolvido por Donelli *et al.* (2001) foram recuperadas 48,6% de bactérias CNS, das quais 36% são *S. epidermidis*. E ainda, Guembe *et al.* (2012) mostrou que das 43,7% CNS, 35,4% são *S. epidermidis*.

1.2.2. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis é um microrganismo ubíquo na pele humana, colonizando as axilas, a cabeça, as narinas, a região da virilha e o espaço interdigital (Kloos & Bannerman, 1994). Desta forma, este microrganismo pode facilmente obter acesso ao cateter através da migração percutânea (Figura 2A) ou da contaminação do conector (Figura 2B). Uma vez em contacto com as superfícies intraluminal e/ou extraluminal do cateter, *S. epidermidis* tem a capacidade de aderir e formar biofilme, sendo este considerado um dos seus principais fatores de virulência (Mack *et al.*, 2007). O biofilme pode estar relacionado com o aumento da tolerância a

antibióticos e aos mecanismos de defesa do paciente e à possibilidade complicações secundárias por dispersão das células de *S. epidermidis* aderidas (Beathard, 1999; Otto, 2009).

1.3. Processo de formação de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*

O processo de formação de biofilme de *S. epidermidis* é complexo e envolve mecanismos que estão ainda em investigação (revisto em Otto, 2008; McCann *et al.*, 2008; Otto, 2009; Arciola *et al.*, 2012). No entanto, com base em modelos *in vitro*, o mecanismo de formação de biofilme de *S. epidermidis* em biomateriais (por exemplo, em cateteres) é tipicamente descrito como um processo que contempla quatro fases (Figura 3) (Otto, 2009).

A primeira etapa da formação de biofilme diz respeito à adesão de células de *S. epidermidis* livres (células planctónicas) à superfície do biomaterial (Figura 3A), a qual pode ser conseguida através de duas estratégias distintas: (1) adesão inicial direta de *S. epidermidis* à superfície ou (2) ligação às proteínas do filme condicionante (Vuong & Otto, 2002). Na primeira estratégia, a interação entre *S. epidermidis* e a superfície do biomaterial é não-específica e impulsionada por forças hidrofóbicas, eletrostáticas e de Van der Waals (Arciola *et al.*, 2012). Esta interação depende das propriedades físico-químicas da superfície do biomaterial e da parede celular de *S. epidermidis* (Vuong & Otto, 2002). Apesar de alguns modelos teóricos tentarem descrever o mecanismo de adesão de *S. epidermidis*, considera-se que o grau de hidrofobicidade da parede celular deste microrganismo e da superfície do biomaterial é determinante na adesão inicial (Arciola *et al.*, 2012). Na segunda estratégia, a adesão de *S. epidermidis* ao biomaterial é específica e mediada por proteínas de *S. epidermidis* (Tabela 2) que atuam como recetores específicos para proteínas que revestem a superfície do biomaterial, designado de filme condicionante (Vuong & Otto, 2002).

Na segunda etapa da formação de biofilme ocorre a agregação e acumulação de *S. epidermidis* em múltiplas camadas (Figura 3B). Este processo é caracterizado pela produção de fatores, como a poli-N-acetilglucosamina, um polissacárido extracelular, e proteínas associadas ao biofilme (Tabela 2), ambas responsáveis pela adesão intercelular de *S. epidermidis* (McCann *et al.*, 2008).

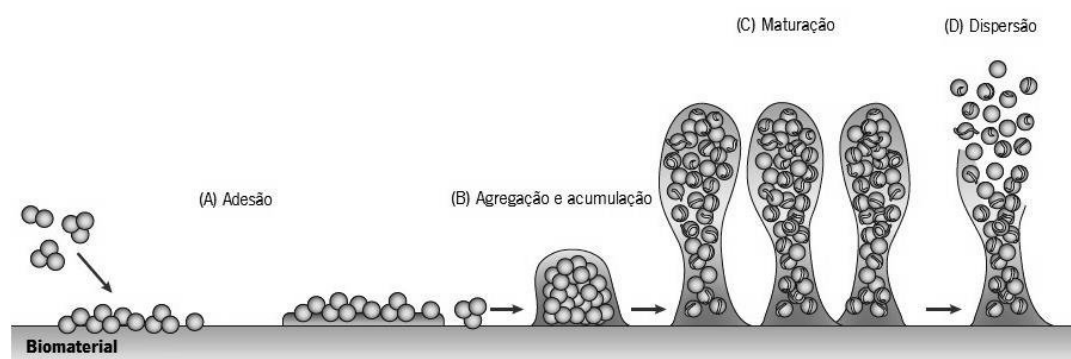


Figura 3: Modelo proposto para a formação de biofilme de *S. epidermidis* que inclui as fases de (A) adesão, (B) agregação e acumulação, (C) maturação e (D) dispersão (adaptado de Otto, 2009).

A fase de maturação do biofilme de *S. epidermidis* (Figura 3C) é caracterizada pela produção da matriz extracelular que envolve as células do biofilme. A matriz extracelular é responsável pela estrutura tri-dimensional e pela coesão entre as células no biofilme (Flemming & Wingender, 2010). Com efeito, a matriz extracelular de *S. epidermidis* é composta por várias proteínas (Tabela 2), polissacáridos (Donlan, 2001), ácidos teicóicos (Sadovskaya *et al.*, 2005) e DNA (Qin *et al.*, 2007).

Na última etapa de formação do biofilme (Figura 3D) as células de *S. epidermidis* circunscritas e protegidas na estrutura do biofilme, podem desprender-se, regressando à fase planctônica. Os fatores e mecanismos que medeiam esta etapa são pouco conhecidos, no entanto, tem sido proposto que esta pode ocorrer através de dois mecanismos: (1) degradação enzimática da matriz extracelular ou (2) destruição das interações não-covalentes por surfactantes (Otto, 2009).

De facto, após a inserção e início de utilização do cateter ocorre a formação de um filme condicionante sobre as superfícies do cateter. Os componentes macromoleculares, presentes no sangue, como por exemplo as proteínas fibronectina, fibrinogénio, vitronectina, colagénio, laminina e elastina aderem à superfície do cateter, modificando-a e mediando a adesão de *S. epidermidis* ao cateter (Arciola *et al.*, 2012). Tradicionalmente, os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade estruturada de células microbianas irreversivelmente aderidas a uma superfície e envolvidas numa matriz polimérica extracelular, formando uma estrutura em “forma

de cogumelo” (Donlan & Costerton, 2002). No entanto, a análise *ex vivo* de cateteres de HD revela que a estrutura de biofilmes de *S. epidermidis* (1) em pacientes com CRBSI consiste em grandes aglomerados de células aderidas à superfície do cateter enquanto (2) em pacientes sem CRBSI, consiste em microcolônias (Jones *et al.*, 2011).

1.3.1. O papel das proteínas na formação do biofilme

Como referido, a formação de biofilme de *S. epidermidis* inclui a ação combinada de vários fatores, entre os quais proteínas. Para além de mediar as diferentes fases deste processo (Figura 3), as proteínas (Tabela 2), nomeadamente as secretadas para o meio extracelular, são potenciais biomarcadores da formação de biofilme, e logo, importantes para o diagnóstico e monitorização terapêutica de infeções (Ranganathan & Garg, 2009).

As proteínas AtlE (do inglês, *Autolysin from S. epidermidis*) e Aae (do inglês, *Autolysin/adhesin from S. epidermidis*) (Heilmann, 2003; Heilmann *et al.*, 1997) associadas à fase de adesão (Figura 3A; Tabela 2)- estão envolvidas na ligação de *S. epidermidis* à superfície do biomaterial/filme condicionante. Em particular, AtlE e a Aae atuam como adesinas envolvidas na ligação de *S. epidermidis* à vitronectina, uma glicoproteína. Adicionalmente, a AtlE e a Aae apresentam atividade de autolisina, que permite quebrar as ligações do peptidoglicano, constituinte da parede celular das bactérias permitindo o crescimento e divisão celular. A atividade de autolisina da AtlE provem dos domínios amidase (60 kDa) e glucosaminidase (52 kDa), que são gerados por processamento proteolítico (Heilmann *et al.*, 1997). A proteína SSP1 (do inglês, *Staphylococcal surface protein*) e o produto da sua clivagem proteolítica- SSP2 - (Tabela 2) que é mediada pela tripsina, parecem contribuir para a adesão de *S. epidermidis* a superfícies de poliestireno (Veenstra *et al.*, 1996).

As adesinas responsáveis pela ligação de *S. epidermidis* ao colagénio são a SdrF (do inglês, *Serine-aspartate repeat containing protein F*), que pertence à família de proteínas Sdr que contém um domínio de repetição serina/aspartato (Arrecubieta *et al.*, 2007) e a GehD, (do inglês, *Glycerol ester hydrolase D*). Adicionalmente, a GehD apresenta atividade de lipase, com a capacidade de hidrolisar lípidos, tendo sido sugerido que as lipases podem contribuir para a virulência de *S. epidermidis*, através de mecanismos ainda pouco compreendidos (Bowden *et al.*, 2002; Longshaw *et al.*, 2000).

Tabela 2: Sumário das proteínas descritas na formação de biofilme de *S. epidermidis*

Proteína	Peso Molecular (kDa)	Função	Referência
Proteínas associadas à fase de adesão			
Aae	35	Autolisina/adesina bifuncional Adesão à vitronectina	(Heilmann, 2003)
AtlE	148	Autolisina/adesina bifuncional Adesão à vitronectina	(Heilmann <i>et al.</i> , 1997)
Embp	1000	Adesão à fibronectina	(Christner <i>et al.</i> , 2010; Williams <i>et al.</i> , 2002)
GehD	45	Adesão ao colagénio	(Bowden <i>et al.</i> , 2002; Longshaw <i>et al.</i> , 2000)
SdrF	†	Adesão ao colagénio	(Arrecubieta <i>et al.</i> , 2007)
SdrG^a	119	Adesão ao fibrinogénio	(Nilsson <i>et al.</i> , 1998)
SSP1/SSP2	280/250	Adesão ao poliestireno	(Veenstra <i>et al.</i> , 1996)
Proteínas associadas à fase de agregação e acumulação			
Aap	220	Adesão intercelular	(Hussain <i>et al.</i> , 1997)
Bap^b	284	Adesão intercelular	(Tormo <i>et al.</i> , 2005)
Proteínas associadas à fase de dispersão			
GluSE	27	Degradação de fibrinogénio	(Ohara-Nemoto <i>et al.</i> , 2002)
PSMs	‡	Citolisinas Surfactantes associados à estruturação do biofilme	(Mehlin <i>et al.</i> , 1999; Yao <i>et al.</i> , 2005)
SepP1	33	Atividade de elastase	(Teufel & Götz, 1993)

^a, Designada também como Fbe; ^b Designada também como Bhp; †, valor não mencionado; ‡, PSMα (2.5 kDa) PSMβ (4.7 kDa) e PSMγ (2.9kDa).

A adesina envolvida na ligação ao fibrinogénio, uma glicoproteína, é a SdrG (do inglês, *Serine-aspartate repeat containing protein G*) que também pertence à família de proteínas Sdr (Nilsson *et al.*, 1998). A ligação de *S. epidermidis* à fibronectina, uma glicoproteína, é mediada pela adesina Embp (do inglês, *Extracellular matrix binding protein*) e pela sua isoforma, com peso

molecular correspondente a 460 kDa. Adicionalmente, a Embp parece estar também envolvida na fase de acumulação (Figura 3B) da formação de biofilme (Christner *et al.*, 2010).

A fase de agregação e acumulação da formação de biofilme (Figura 3B; Tabela 2) depende da proteína Aap (do inglês, *Accumulation associated protein*), que é essencial para a acumulação de *S. epidermidis* em múltiplas camadas (Hussain *et al.*, 1997). Adicionalmente, a proteína Aap favorece a formação de fibrilas na parede celular em algumas estirpes de *S. epidermidis*, facilitando o processo de adesão intercelular (Banner *et al.*, 2007). Por outro lado, a proteína Bap (do inglês, *Biofilme-associated protein homolog*), expressa em algumas estirpes de *S. epidermidis*, está associada à acumulação e agregação intercelular (Tormo *et al.*, 2005), apesar de esta proteína não parecer ser essencial para a formação de biofilme (Lasa & Penadés, 2006).

Em paralelo com o escasso conhecimento sobre o processo de dispersão do biofilme (Figura 3D), também as proteínas envolvidas neste processo estão pouco caracterizadas (Otto, 2012). Como mencionado (item 1.3.), a estratégia de degradação enzimática da matriz extracelular tem sido implicada neste processo no entanto, não existem evidências de que *S. epidermidis* expressa proteases capazes de degradar a poli-N-acetilglucosamina, um dos principais constituintes da matriz extracelular (Flemming & Wingender, 2010), contrariamente ao que se verifica em outras espécies (Kaplan *et al.*, 2004). Ainda assim, *S. epidermidis* de facto produz proteases com capacidade de quebrar as ligações peptídicas de proteínas como a metaloprotease, SepP1 (do inglês, *S. epidermidis protease 1*) (Teufel & Götz, 1993) e a endopeptidase, GluSE (do inglês, *Glutamyl endopeptidase from S. epidermidis*) (Ohara-Nemoto *et al.*, 2002). No entanto, pensa-se que estas enzimas podem estar envolvidas na degradação de proteínas da parede celular (Otto, 2009). Alternativamente, sugere-se que o processo de dispersão do biofilme pode ocorrer através da destruição das interações não-covalentes por surfactantes. Em específico, as PSMs (do inglês, *phenol-soluble modulins*) (Mehlin *et al.*, 1999) podem estar envolvidas na quebra de interações não covalentes (tais como, interações eletrostáticas e hidrofóbicas) que ocorrem, por exemplo, entre poli-N-acetilglucosamina e polímeros da parede celular ou entre regiões hidrofóbicas da parede celular (Otto, 2009). As PSMs compreendem pelo menos três componentes peptídicos PSM α , PSM β , e PSM γ (δ -toxina) (Yao *et al.*, 2005). Em particular, tem sido reportado que a δ -toxina tem a capacidade de inibir as interações hidrofóbicas entre regiões da parede bacteriana, diminuindo a tensão de superfície

na interface do biofilme, e assim promover a separação e dispersão das células do biofilme (McCann *et al.*, 2008). Para além da função associada à dispersão do biofilme, a δ -toxina possui a capacidade de lisar células do sistema imunitário, tais como neutrófilos e monócitos (Otto, 2012).

Como se pode constatar, o conhecimento sobre as proteínas que medeiam as diferentes fases de formação de biofilme nomeadamente, em relação à fase de maturação e de dispersão é limitado. Deste modo, é importante o desenvolvimento de abordagens para o estudo das proteínas associadas ao processo de formação de biofilme de *S. epidermidis*.

A abordagem utilizada na investigação das proteínas supracitadas (Tabela 2) implica, em geral, (1) a análise em gel de eletroforese unidimensional para a separação e isolamento das proteínas e (2) a análise de espetrometria de massa para identificação da proteína. A primeira abordagem é a mais frequentemente utilizada. De facto, todas as proteínas descritas na Tabela 2 com exceção da Embp e PSMs, foram identificadas e caracterizadas através desta estratégia-gel de eletroforese unidimensional-. A investigação das proteínas Embp e PSMs (Tabela 2) foi realizada, por exemplo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (para as PSMs), através da segunda abordagem e consistiu na análise de espetrometria de massa. Em específico, a identificação de cada componente das PSMs foi realizada através de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espetrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS).

1.4. MALDI-TOF MS em microbiologia: implicações experimentais

O estudo sistemático das proteínas expressas pelo genoma de uma determinada célula, incluindo todas as isoformas e modificações proteicas, e a interação entre elas é designado de proteómica (Bantscheff *et al.*, 2012). Recentemente, a análise proteómica baseada em MALDI-TOF MS tem-se revelado uma das metodologias mais informativas no que respeita ao estudo de proteínas (Matthiesen & Bunkenborg, 2013).

De uma forma geral, MALDI-TOF MS é uma técnica rápida, sensível e versátil para a análise de proteínas de origem biológica e com diferentes potencialidades (Tabela 3). A técnica de MALDI-TOF MS permite a identificação, quantificação, caracterização estrutural e investigação

de modificações proteicas (Lay, 2002). Por exemplo, em microbiologia, entre outras aplicações, é possível utilizar esta técnica para a identificação de microrganismos, uma vez que permite gerar padrões de massa molecular específicos para cada microrganismo. Mais recentemente, tem sido dada especial atenção à identificação de biomarcadores de virulência e caracterização de microrganismos potencialmente causadores de infecção. (Croxatto *et al.*, 2012). Contudo, não é do nosso conhecimento que estes estudos tenham sido efetuados em *S. epidermidis*.

Na presente introdução são descritos os principais aspetos experimentais associados à técnica MALDI-TOF MS, com particular ênfase para a investigação qualitativa de perfis proteicos. Uma vez que, apesar de altamente promissora a técnica de MALDI-TOF MS, depende da qualidade do espetro de massa, que está intrinsecamente dependente de vários parâmetros técnicos. Deste modo, para aumentar a reprodutibilidade da metodologia é crucial a otimização destes parâmetros nomeadamente, a preparação da amostra ou a seleção da matriz.

Tabela 3: Exemplos de potenciais aplicações, com ênfase particular em microbiologia, da técnica de MALDI-TOF MS

Potenciais aplicações de MALDI-TOF MS	Referência
Identificação de proteínas	(Cordwell <i>et al.</i> , 1995)
Análise de DNA e RNA bacteriano	(Hurst <i>et al.</i> , 1996; Kirpekar <i>et al.</i> , 2000)
Quantificação de proteínas	(Stöcklin <i>et al.</i> , 1997)
Deteção e caracterização de proteínas recombinantes	(Yan <i>et al.</i> , 1999)
Identificação de microrganismos	(Santos <i>et al.</i> , 2011)
Deteção de biomarcadores	(Misra <i>et al.</i> , 2012)
Estudo da resistência de microrganismos a antibióticos	(Hrabák <i>et al.</i> , 2013)

1.4.1. Princípio da técnica

A técnica de MALDI-TOF MS (Figura 4) desenvolvida por Karas e Hillenkamp, em 1988, permite a ionização suave de biomoléculas não-voláteis, como as proteínas. Nesta técnica, numa primeira fase, a amostra é misturada com a matriz (item 1.4.3.) resultando na co-cristalização das moléculas da amostra e da matriz. Esta mistura é bombeada por um laser (Mann *et al.*, 2001). A matriz absorve a energia do laser, transferindo-a para as moléculas da amostra resultando na dessorção e ionização suave das moléculas da amostra/matriz (Figura 4A), formando uma “nuvem” de iões na fase gasosa. Os iões são acelerados (Figura 4B), para um tubo de tempo de voo, através da ação de um campo eletrostático, e separados de acordo com o tempo de voo (Figura 4C). A dimensão dos iões é diretamente proporcional ao tempo de voo, que compreende o tempo decorrido entre o sinal inicial do laser e a deteção dos iões (Figura 4D). Logo, o tempo de voo necessário para os iões chegarem ao detetor depende da massa (m) e da carga (z) das proteínas. Como resultado é produzido um espectro, designado de perfil, que associa a razão m/z e a intensidade do sinal (Figura 4E) (Shah & Gharbia, 2010) conseguinte, a análise MALDI-TOF MS produz um perfil proteico único e característico da amostra (Figura 4E) (Carbonnelle *et al.*, 2011).

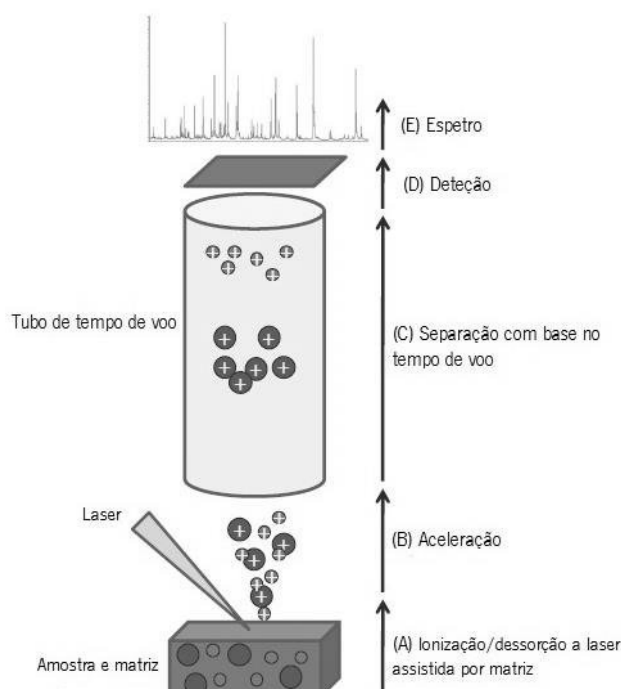


Figura 4: Esquema da técnica MALDI-TOF MS (adaptado de Croxatto *et al.*, 2012).

1.4.2. Preparação da amostra

1.4.2.1. Sobrenadantes

A metodologia de preparação de extratos proteicos a partir de sobrenadantes recolhidos após cultura microbiana inclui, em geral, a precipitação e posterior determinação da concentração proteica da amostra (Ziebandt *et al.*, 2010). Os métodos de precipitação de proteínas mais utilizados incluem a utilização de acetona, clorofórmio/metanol, sulfato de amónio ou ácido tricloroacético (TCA, do inglês *trichloroacetic acid*) e ultrafiltração (Jiang *et al.*, 2004). O TCA é o solvente mais frequentemente utilizado para preparação de amostras para análise proteómica (Rajalingam *et al.*, 2009). O mecanismo pelo qual o TCA promove a precipitação proteica ainda não está claramente compreendido, no entanto alguns autores têm sugerido que a natureza acídica do TCA favorece alterações conformacionais na estrutura das proteínas que facilitam a sua precipitação (Ahmad *et al.*, 2000). Paralelamente têm surgido no mercado *kits* de precipitação e limpeza de proteínas, que são mais rápidos e eficientes, removendo eficazmente sais e surfactantes (National Diagnostics, 2011). Assim, se a pureza da amostra for superior, a qualidade dos espectros de MALDI-TOF MS é potenciada.

1.4.2.2. Frações celulares

Os estudos relativos à investigação de perfis proteicos de frações celulares, por MALDI-TOF MS estabelecem protocolos para a preparação das amostras focados principalmente em duas estratégias. A primeira refere-se à análise de células bacterianas intactas, que são recolhidas após cultura em agar ou recuperadas a partir de meio de cultura líquido após centrifugação; a segunda refere-se a protocolos baseados na extração de proteínas a partir de culturas bacterianas utilizando solventes (Šedo *et al.*, 2011a).

A análise MALDI-TOF MS de células intactas é uma estratégia amplamente estudada e utilizada revelando-se um método simples e rápido. No entanto, o mecanismo através do qual ocorre a libertação das proteínas intracelulares ainda não é claramente compreendido. No entanto, um estudo de Madonna *et al.* (2000) sugere que são formados pequenos poros na parede celular a partir dos quais são libertados as proteínas intracelulares. Adicionalmente,

Vaidyanathan *et al.* (2002) provou que várias proteínas detetadas durante a análise MALDI-TOF MS são detetadas no sobrenadante após centrifugação da cultura bacteriana. Deste modo, pensa-se que a libertação de proteínas intracelulares ocorre durante todo o processo de preparação da amostra e também durante a fase de ionização (Figura 4A).

A segunda abordagem, a extração de proteínas bacterianas com solventes é em geral, um método mais moroso do que o referido anteriormente (Fournier *et al.*, 2012). A avaliação de diferentes solventes na extração de proteínas mostrou que são os solventes hidrofílicos como, o ácido fórmico e o acetonitrilo, aqueles com maior capacidade de extração (Wang *et al.*, 1998). A extração de proteínas a partir de culturas bacterianas pode ser também conseguida através do tratamento enzimático (por exemplo, com lisozima) ou com tratamentos físicos (por exemplo, sonicação ou termólise) (Šedo *et al.*, 2011a).

De facto, não existe um método padrão para a preparação da amostra nem um consenso em relação à equivalência entre os espetros obtidos com as diferentes abordagens.

a) Seleção do solvente para suspensão celular

Nos protocolos baseados em ambas as abordagens referidas anteriormente, as etapas de lavagem e/ou suspensão de culturas bacterianas são importantes de forma a reduzir o teor de sais e impurezas presentes na amostra. Vários autores têm investigado a utilização de diferentes solventes para lavagem de células bacterianas. A lavagem das células com 0,1% ácido trifluoroacético (TFA; do inglês *trifluoroacetic acid*) produz espetros com elevada resolução, maior número de picos detetados e maior intensidade de sinal, em comparação com água e etanol (Ruelle *et al.*, 2004) e diferentes misturas de solventes tais como clorofórmio: metanol (1:1), 2-propanol:acetonitrilo (1:1), ácido fórmico:2-propanol:água (1:2:3) e clorofórmio:2-propanol (1:1) (Liu *et al.*, 2007).

b) Influência da concentração celular

A qualidade dos espetros é altamente influenciada pela concentração celular. A concentração celular ótima, na qual são obtidos espetros com melhor qualidade, i.e., maior número de picos detetados e intensidade do sinal, foi investigada por diferentes autores. Por exemplo, Liu *et al.* (2007) mostrou que para células intactas de *Bacillus anthracis* lavadas com

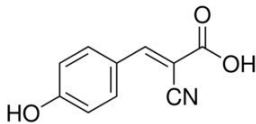
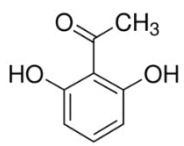
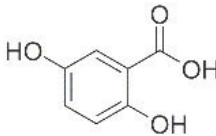
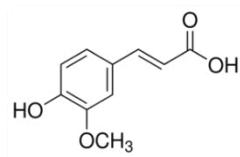
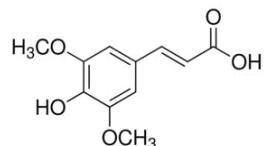
0,1% TFA os espectros com maior intensidade de sinal se obtêm com 4 mg de células. No entanto, Böhme *et al.* (2010) na análise de diferentes bactérias patogênicas isoladas de marisco, observou que o aumento quantidade de proteína bacteriana, desde 0,7 até 5 mg, reduz a qualidade do espectro obtido. A determinação da concentração celular ótima de extratos foi investigada, por exemplo, por Johnson *et al.* (2009) estimando-se que com $2,70 \times 10^6$ células/mL de *S. aureus* são produzidos espectros com maior qualidade.

1.4.3. Seleção da matriz

A matriz é normalmente um composto de natureza acídica que possui elevada capacidade de absorção no comprimento de onda usado no laser. Na literatura estão descritas várias matrizes, por exemplo a matriz CHCA (do inglês, *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*), FA (do inglês, *ferulic acid*), SA (do inglês *sinapinic acid*) e DHAP (do inglês, *dihydroxy-acetophenone*) (Tabela 4). Não se verifica um consenso quanto à matriz ótima para a análise de células intactas e/ou extratos de culturas bacterianas (Šedo *et al.*, 2011a). Por conseguinte, a seleção da matriz é normalmente realizada de acordo com a sua adequabilidade para o estudo de diferentes intervalos m/z e moléculas a estudar. Por exemplo, a matriz CHCA, parece ser mais adequada para o estudo de proteínas de baixo peso molecular (< 3 kDa) (Petersen *et al.*, 2009), uma vez que é detetado um maior número de picos e com maior intensidade na zona de pesos moleculares mais baixos (Ruelle *et al.*, 2004). Por outro lado, para a investigação de péptidos e proteínas de peso molecular superior, nomeadamente até 15 kDa, as matrizes SA e FA são as mais adequadas. Ainda assim, e mais especificamente, um estudo no qual são comparadas as três matrizes (CHCA, FA e SA) na análise de proteínas com elevada peso molecular (> 20 kDa), a partir de células intactas, foi observado um maior número de picos com a matriz FA (Madonna *et al.*, 2000). Note-se ainda que, a contaminação das amostras, pela presença de sais, é frequente no entanto, tem sido reportado que a matriz FA permite gerar espectros com elevada qualidade na presença de elevadas concentrações de sais (Börnsen *et al.*, 1997). Adicionalmente, sugere-se que a matriz DHAP permite uma análise altamente sensível de proteínas e glicoproteínas com elevado peso molecular (de 8 a 100 kDa).

Assim, o uso de diferentes matrizes traduz-se em diferenças significativas no número e na intensidade de picos detetados, sendo a seleção da matriz mais adequada para análise MALDI-TOF MS determinante para o sucesso da análise.

Tabela 4: Algumas das matrizes frequentemente utilizadas na análise MALDI-TOF MS e as suas aplicações

Matriz	Estrutura química	Aplicações	Referência
CHCA		Péptidos e proteínas (< 10 kDa) Lípidos Nucleótidos	(Kong <i>et al.</i> , 2001; Li <i>et al.</i> , 2005; Ruelle <i>et al.</i> , 2004)
DHAP		Proteínas (8 a 100 kDa) Glicoproteínas	(Pitt & Gorman, 1996; Wenzel <i>et al.</i> , 2006)
DHB		Péptidos e proteínas (< 10 kDa)	(Bourcier <i>et al.</i> , 2001)
FA		Proteínas (1,5 a >15 kDa)	(Madonna <i>et al.</i> , 2000; Kemptner <i>et al.</i> , 2009)
SA		Péptidos e proteínas (> 10 kDa) Lípidos	(Fuchs <i>et al.</i> , 2010; Šedo <i>et al.</i> , 2011b)

1.4.4. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à consistência dos resultados quando são realizadas experiências independentemente e sob as mesmas condições e é essencial no desenvolvimento de uma metodologia (Albrethsen, 2007). No entanto, a variabilidade dos resultados de MALDI-TOF MS depende de vários fatores como, por exemplo, da instrumentação, da preparação da amostra (item 1.4.2.), da seleção da matriz (item 1.4.3.), entre outros e por conseguinte, obter resultados reprodutíveis é uma das maiores dificuldades na análise MALDI-TOF MS (Fenselau & Demirev, 2001). No entanto é frequente não encontrar descrita na literatura a análise da reprodutibilidade em estudos que utilizam MALDI-TOF MS. Assim, a falta de reprodutibilidade

pode invalidar os resultados obtidos (Šedo *et al.*, 2011a). No entanto, análises de reprodutibilidade intralaboratório e interlaboratório são descritas em alguns estudos. No estudo de Saenz *et al.* (1999) a reprodutibilidade intralaboratório, da análise MALDI-TOF MS de células intactas lavadas foi realizada por comparação dos espectros obtidos a partir da mesma amostra, em diferentes dias e preparada por diferentes operadores. A reprodutibilidade intralaboratório foi avaliada através da inspeção visual das listas de picos gerados, mostrando que os espectros MALDI-TOF MS produzidos são semelhantes. Por outro lado, o estudo de Wang *et al.* (1998) verificou existir reprodutibilidade interlaboratorial, na análise MALDI-TOF MS de suspensões celulares, preparada nas mesmas condições mas em laboratórios diferentes. No entanto, estas conclusões foram obtidas após análise visual dos picos detetados em cada amostra. De facto, em grande parte dos estudos nesta área, a reprodutibilidade é realizada através da comparação visual dos picos detetados.

Em suma, MALDI-TOF MS é uma técnica emergente e com diferentes potenciais aplicações. Em particular, em microbiologia permite a identificação de microrganismos, que se encontra amplamente estudada e descrita (Croxatto *et al.*, 2012). Adicionalmente, têm sido estudadas novas aplicações como a caracterização de microrganismos e deteção de biomarcadores para monitorização terapêutica e diagnóstico de infeções associadas a microrganismos potencialmente patogénicos. No entanto, o sucesso da análise baseada na técnica MALDI-TOF MS é altamente influenciado por diferentes fatores experimentais sendo crucial a otimização dos mesmos.

1.5. Objetivos

O principal objetivo da presente dissertação consistiu na caracterização de biofilmes de *S. epidermidis* utilizando MALDI-TOF MS. Os objetivos específicos incluíram: (1) o isolamento e a semiquantificação de microrganismos associados a cateteres de HD, (2) a identificação dos microrganismos recuperados de cateteres de HD, (3) a avaliação da capacidade de estirpes de *S. epidermidis* isoladas de cateteres de HD em formar biofilme *in vitro*, e (4) a otimização de uma metodologia baseada na técnica MALDI-TOF MS para análise do perfil proteico de sobrenadantes e de frações celulares de biofilmes de *S. epidermidis* formados *in vitro*.

Capítulo 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Meios de cultura

2.1.1. *Tryptic Soy Broth*

O *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Liofilchem®) foi preparado com uma concentração de 30 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

O TSB suplementado com glicerol (AppliChem®) foi preparado a partir de TSB ao qual foi adicionado 15% (v/v) de glicerol. Após esterilização, foi armazenado à temperatura ambiente.

2.1.2. *Tryptic Soy Agar*

O *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Liofilchem®) foi preparado com uma concentração de 40 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

O TSA sangue foi preparado a partir de *Tryptose Blood Agar Base* (Oxoid) a uma concentração de 30 g/L e esterilizado a 121°C durante 20 min. Após o arrefecimento do meio de cultura até aproximadamente 45°C, foi adicionado 7% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro (Probiológica). O meio foi armazenado a 4°C.

2.1.3. *Brain Heart Infusion Agar*

O *Brain Heart Infusion* (BHI) agar (Biokar Diagnostics®) foi preparado com uma concentração de 37 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

2.1.4. *Eosin Methylene Blue Agar*

O *Eosin Methylene Blue* (EMB) agar (Liofilchem®) foi preparado com uma concentração de 37,5 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado a 4°C.

2.1.5. *Mannitol Salt Agar*

O *Mannitol Salt Agar* (MSA) (Liofilchem®) foi preparado com uma concentração de 111 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado a 4°C.

2.1.6. *Luria - Bertani Agar*

O *Luria - Bertani* (LB) agar (Liofilchem®) foi preparado com uma concentração de 35 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado a 4°C.

2.2. Soluções

2.2.1. Solução salina

A solução salina foi preparada com uma concentração de 0,9 g/L de NaCl (Scharlau®), esterilizada a 121°C durante 20 min e armazenada à temperatura ambiente.

2.2.2. Violeta Cristal

A solução de violeta cristal foi preparada com 1% (v/v) de violeta cristal (Merck ®) e armazenada à temperatura ambiente.

2.2.3. Matriz *2,5-dihydroxybenzoic acid*

A solução da matriz *2,5-dihydroxybenzoic acid* (DHB) foi preparada com uma concentração de 75 g/L de DHB (Sigma) em etanol (Sigma)/água/acetonitrilo (Sigma) [1:1:1] e 0,03% (v/v) de ácido trifluoroacético (Sigma). A solução foi homogeneizada no vortex, mantida no escuro a 4 °C e utilizada no próprio dia.

2.2.4. Matriz *α-cyano-4-hydroxycinnamic acid*

A solução saturada da matriz CHCA foi preparada com uma concentração de 30 g/L de CHCA (Sigma) em etanol /água/acetonitrilo [1:1:1] e 0,03% (v/v) de ácido trifluoroacético. A solução foi homogeneizada no vortex, e de seguida, foi centrifugada a 9000 rpm durante 5 min (Scanspeed 1730 R). O sobrenadante foi recuperado, mantido no escuro a 4 °C e utilizado no próprio dia.

2.2.5. Matriz *ferulic acid*

A solução da matriz FA foi preparada com uma concentração de 30 g/L de FA (Sigma) em etanol/acetonitrilo [1:0,4]. Posteriormente, a solução foi homogeneizada no vortex, mantida no escuro a 4 °C e utilizada no próprio dia.

2.3. Microrganismos

2.3.1. Microrganismos

Os isolados clínicos de *S. epidermidis* HD41.1 - 41.4 referenciados neste estudo foram recuperados de cateteres de HD segundo o procedimento descrito no item 2.4.3. Adicionalmente, para o estudo da formação de biofilme (item 2.5.3.) e para a investigação do perfil de MALDI-TOF MS das respetivas frações (item 2.6.1.) foram utilizados isolados clínicos de *S. epidermidis* HD20.2 e HD16.3 (**Anexo**).

Para a calibração externa do MALDI-TOF MS foi utilizado o microrganismo de referência, *E. coli* DH5 α , cedida pela Micoteca da Universidade do Minho, *Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering* (IBB-CEB).

2.3.2. Armazenamento e criopreservação dos microrganismos

Todas as estirpes foram armazenadas a 4°C, em meio TSA, por um período máximo de quatro semanas. Para a criopreservação dos microrganismos, estes foram cultivados em TSA, a 37°C durante 24 h. Após este período, as colónias dos microrganismos foram ressuspensas em TSB suplementado com glicerol e armazenadas a - 80°C (Perry, 1998).

2.4. Pesquisa de microrganismos em cateteres de hemodiálise

2.4.1. Pacientes

Neste estudo, no período de Outubro a Dezembro de 2012, foram incluídos pacientes adultos do Departamento de Nefrologia do Centro Hospitalar do Porto-Hospital de Santo António

a realizar HD, como terapia de substituição renal, e com acesso venoso permanente efetuado através de cateteres. Os cateteres foram removidos por indicação clínica.

2.4.2. Cateteres de hemodiálise

Os cateteres de HD foram recolhidos, colocados em sacos estéreis, selados e enviados para o IBB-CEB no próprio dia.

2.4.3. Recuperação de microrganismos de cateteres de hemodiálise

O processamento dos cateteres de HD consistiu na sua segmentação, em condições de assepsia, em três segmentos- o *cuff*, o segmento proximal e a ponta (Figura 1), sempre que aplicável. Cada segmento foi cultivado segundo o método de Maki *et al.*, (1977), consistindo no rolamento do segmento do segmento para a frente e para trás numa placa de BHI agar, pelo menos quinze vezes. De seguida, a placa foi incubada a 37°C, durante 24 a 72 h. Após a incubação foi registado o número de UFCs observadas, sendo o limite de deteção correspondente a 1 UFC.

2.4.3.1. Identificação presuntiva dos microrganismos

A identificação presuntiva dos isolados clínicos obtidos no item 2.4.3. consistiu no seu cultivo em meios seletivos e diferenciais, nomeadamente em EMB agar e MSA. As placas foram incubadas aerobiamente, a 37°C, durante 18 a 24 h para o meio EMB agar e 24 a 48 h para o meio MSA. Decorrido o período de incubação, foram observadas e registadas as características das colónias, nomeadamente, o crescimento, a cor das colónias e a cor do meio (sempre que aplicável).

2.4.3.2. Identificação definitiva dos microrganismos

A identificação definitiva dos isolados clínicos obtidos no item 2.4.3. foi efetuada por MALDI-TOF MS, como descrito por Santos *et al.* (2011). Para isso, os isolados foram cultivados em TSA sangue a 37°C durante 24 h. De seguida, duas a três colónias foram transferidas para a placa de MALDI-TOF MS e gentilmente misturada com 0,5 µL da solução da matriz DHB e seca à temperatura ambiente. A análise de cada isolado clínico foi realizada utilizando o sistema

Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu) equipado com um laser de nitrogénio (337 nm). Foram registados os espetros no intervalo de m/z 2000 a 20000. Os espetros foram adquiridos no modo linear (*power* 110, *laser repetition rate* 20 Hz e 50 *profile* /20 *shot*). A estirpe *E. coli* DH5 α , cultivada em LB agar, a 37°C durante 18 h foi utilizada para a calibração externa. Cada isolado clínico e a estirpe *E. coli* DH5 α foram analisados em duplicado. A identificação de cada isolado clínico foi realizada utilizando o *software* SARAMIS (AnagnosTec mbH).

2.5. Estudo de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* formados *in vitro*

2.5.1. Condições de cultura

Os isolados clínicos *S. epidermidis* HD20.2 e HD16.3 criopreservados tal como descrito no item 2.3.2., foram recuperados em meio TSA com incubação a 37°C durante 24 h. Após o período de incubação foi realizada uma sub-cultura dos isolados em meio TSA com incubação a 37°C, durante 24 h. Após verificar a pureza da sub-cultura de *S. epidermidis* foram transferidas 3 a 5 colónias para 5 mL de TSB. A suspensão obtida foi homogeneizada com auxílio do vortex e sonicada (Sonicor, 50/60 Hz) durante 5 min. A densidade ótica a 625 nm (D.O._{625nm}) (Tecan, Sunrise™) da suspensão bacteriana foi ajustada à do padrão McFarland 1, correspondendo a aproximadamente 3×10^8 UFC/mL. A suspensão bacteriana obtida foi diluída 1:10 em TBS. Esta suspensão bacteriana foi utilizada para inocular as placas de 96 poços previamente revestidas (item 2.5.2.).

2.5.2. Revestimento dos poços da placa de 96 poços

Para o revestimento dos poços da placa de 96 poços de fundo plano foram transferidos 150 μ L de soro fetal bovino (Gibco®) para cada poço. Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C durante 18 h. O soro fetal bovino foi removido e de seguida realizada a lavagem de cada poço com 150 μ L de água estéril.

2.5.3. Formação de biofilme

O procedimento de formação de biofilme foi efetuado como descrito por Harrison *et al.* (2010). Para a inoculação da placa de 96 poços foram transferidos 150 µL da suspensão bacteriana obtida (item 2.5.1.), para cada poço previamente revestido (item 2.5.2.). O branco consistiu em meio TSB. A placa de 96 poços foi incubada a 37°C e 5% CO₂, durante 24 h.

De seguida, o sobrenadante de cada poço da placa de 96 poços foi recolhido e centrifugado a 9000 rpm, 4°C, durante 5 min. O sobrenadante foi filtrado e posteriormente preservado a - 20°C. O branco foi processado da mesma forma. O sedimento, correspondendo às células planctónicas, foi ressuspenso em água ultrapura estéril num volume equivalente ao inicial.

Cada poço da placa de 96 poços, contendo as células em biofilme, foi lavado com 150 µL de solução salina para remover as células não aderidas. De seguida, foi adicionado a cada poço 150 µL de solução salina e a placa foi sonicada durante 20 min. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi raspado e lavado com 150 µL de solução salina. A suspensão celular foi homogeneizada no vortex e centrifugada a 9000 rpm, 4°C durante 5 min. O sedimento obtido após a centrifugação, correspondendo às células do biofilme, foi ressuspenso em água ultrapura estéril, num volume equivalente ao inicial.

A placa de poços foi incubada a 87°C durante 60 min para posterior determinação da biomassa total (item 2.5.3.2), como controlo da remoção de biofilme.

2.5.3.1. Determinação do número de células cultiváveis

As frações celulares (células de biofilme e planctónicas) recuperadas foram diluídas serialmente. De seguida, 10 µL de cada diluição foram incubados em TSA, a 37°C durante 24 h. Por cada diluição foram efetuadas 4 réplicas. Após o período de incubação, foi enumerado o número de UFCs.

2.5.3.2. Determinação da biomassa total

A coloração por violeta cristal foi utilizada como indicador da biomassa total do biofilme, adaptando o procedimento descrito por Stepanovic *et al.* (2000) e Kwasny & Opperman (2010). Sumariamente, após a remoção do sobrenadante, os poços na placa de 96 poços foram lavados duas vezes com 150 μ L água estéril e de seguida, a placa foi incubada a 87°C, durante 60 min. Depois, 150 μ L de violeta cristal foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada à temperatura ambiente, durante 5 min. O violeta cristal foi removido e cada poço foi lavado duas vezes com 150 μ L de água estéril. A placa foi deixada a secar à temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, foram adicionados 150 μ L de etanol (Sigma) 100% a cada poço. Após homogeneização, foram transferidos 100 μ L do conteúdo de cada poço para uma nova placa. Por último, foi realizada leitura da D.O. a 570 nm.

2.5.4. Análise dos dados

Para cada experiência foram realizados, pelo menos, dois ensaios independentes com oito réplicas cada. A análise estatística foi realizada usando o *software GraphPad Prism* versão 5.00. A normalidade dos dados foi verificada através do teste *D'Agostino & Pearson*. Os resultados da (i) determinação do número de células cultiváveis foram transformados em Log (UFC/mL) e da (ii) determinação da biomassa total foram normalizados em função do número de células de biofilme. A comparação dos resultados foi realizada usando o teste Mann–Whitney, com nível de significância de 0,5% ($P < 0,05$).

2.6. Investigação do perfil MALDI-TOF MS de sobrenadantes e frações celulares de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* formado *in vitro*

Na otimização inicial da metodologia foi utilizada a estirpe *S. epidermidis* HD20.2. Após a recuperação de sobrenadantes e frações celulares do biofilme de *S. epidermidis* formado *in vitro* (Figura 5A) foram otimizados os parâmetros pré-analíticos (Figura 5B), nomeadamente a solução de matriz, designadamente, a matriz CHCA e FA (Tabela 4) e diferentes quantidades de amostra.

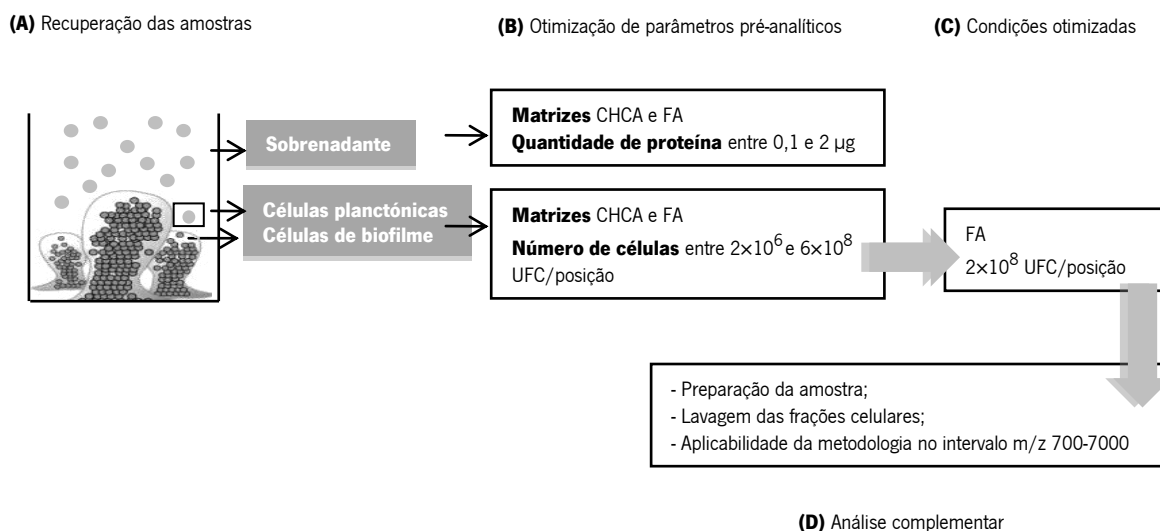


Figura 5: Fluxograma relativo à recolha da amostra e às etapas de otimização de MALDI-TOF MS de sobrenadantes e frações celulares de biofilme de *S. epidermidis* formado *in vitro*.

Para as condições otimizadas (Figura 5C) foi avaliado o tipo de preparação da amostra e validada a utilização do TFA (Figura 5D) no sentido de definir a metodologia associada a espectros com melhor qualidade, ou seja, espectros nos quais é adquirido o maior número de picos (Williams *et al.*, 2003). As listas de picos obtidas representam o perfil MALDI-TOF MS. Por último, foi estudada a aplicabilidade da metodologia otimizada no intervalo m/z entre 700 e 7000 (Figura 5D).

2.6.1. Preparação da amostra

2.6.1.1. Sobrenadantes

Os sobrenadantes de biofilme de *S. epidermidis* (item 2.5.3.) foram processados para análise MALDI-TOF MS. Após o descongelamento da amostra em gelo, foi realizada a precipitação das proteínas utilizando o *ND™ Protein Precipitation kit* (National Diagnostics). Por cada 1 mL de sobrenadante foram adicionados 50 µL do reagente A e a amostra foi agitada. De seguida, foram adicionados 100 µL do reagente B e procedendo-se a uma incubação de 20 min à temperatura ambiente, para a precipitação das proteínas. A amostra foi centrifugada a 9000 rpm, 4°C, durante 5 min, o sobrenadante foi dispensado e o sedimento foi suspenso em

acetona e foi novamente centrifugado a 9000 rpm, 4°C, durante 5 min. O sedimento foi lavado com etanol 70%, para remover sais e surfactantes e de seguida foi ressuspensão em 20 µL de água ultrapura. Posteriormente, foi realizada a determinação da concentração proteica utilizando o *BCA Protein Assay kit* (Thermo Scientific). Sumariamente, a 25 µL da amostra foram adicionados 200 µL de reagente A/reagente B [50:1]. Após homogeneização, procedeu-se a uma incubação a 37°C durante 30 min. Finalmente, foi registada a leitura da D.O. a 562 nm.

Após a preparação de soluções com diferentes quantidades de proteína (2 - 0,1 µg), cada uma foi misturada com 1 µL de matriz CHCA ou FA (item 2.2.4 e 2.2.5), aplicado na placa de MALDI-TOF MS e deixado secar à temperatura ambiente.

2.6.1.2. Frações celulares

As frações celulares de biofilme de *S. epidermidis* obtidas *in vitro*, foram processadas para análise MALDI-TOF MS utilizando entre 2×10^6 e 6×10^8 UFC/posição da placa de MALDI-TOF MS (Fleximass™ DS), no sentido de determinar o número de células ótimo. Duas estratégias de preparação da amostra foram consideradas. Primeiro, para a preparação de células bacterianas intactas (Madonna *et al.*, 2000) a D.O._{625nm} da suspensão celular foi ajustada a 0,1. Cada cultura foi sub-dividida em alíquotas de 1 mL. As amostras foram centrifugadas a 9000 rpm, 4°C, durante 5 min. O sedimento foi ressuspensão em 100 µL de 0,1% TFA e a amostra centrifugada novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 3 µL da solução da matriz (itens 2.2.4. e 2.2.5.), aplicado na placa de MALDI-TOF MS e deixado secar à temperatura ambiente. Segundo, foi utilizada a estratégia de preparação de extratos bacterianos por adaptação do procedimento de Wolters *et al.* (2011). Sumariamente, a D.O._{625nm} da suspensão celular foi ajustada a 0,1. Cada cultura foi sub-dividida em alíquotas de 0,5 mL. A cada amostra foram adicionados 1,5 mL de etanol 100% e de seguida, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm, 4°C, durante 5 min. O sedimento foi ressuspensão em 100 µL de ácido fórmico 70% e acetonitrilo (1:1), e a amostra foi centrifugada a 9000 rpm, 4°C, durante 5 min. O sobrenadante, contendo o extrato bacteriano, foi recolhido. Um microlitro desta amostra foi misturado com 1 µL da solução da matriz (itens 2.2.4. e 2.2.5.), aplicado na placa de MALDI-TOF MS e deixado secar à temperatura ambiente.

Para análise da reprodutibilidade (item 2.6.3.1.) das frações celulares processadas com a matriz FA e com número de células correspondente a 2×10^8 UFC/posição, foram realizadas três réplicas independentes, cada uma com quatro réplicas dependentes.

2.6.2. Análise de MALDI-TOF-MS

A análise das amostras de sobrenadante e das frações celulares foi efetuada utilizando o sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu) equipado com um laser de nitrogénio (337 nm). Foram registados os espetros no intervalo m/z 700 a 3000 e 3000 a 7000. Para a calibração foram utilizados os calibrantes bradicinina (MW 757,3997) (Sigma; 3,5 nmol/mL) e angiotensina II (MW 1 046,5423) (Sigma; 3,5 nmol/mL) e a estirpe de *E. coli* DH5 α , cultivada em LB agar, a 37°C, durante 18 h. Os espetros foram adquiridos no modo linear. No que respeita às amostras analisadas com a matriz CHCA foram utilizados os seguintes parâmetros: *power* 91, *laser repetition rate* 20 Hz e 100 *profile* / 5 *shot*. No caso de amostras analisadas com a matriz FA, os parâmetros utilizados foram: *power* 110, *laser repetition rate* 20 Hz e 50 *profile*/20 *shot*.

2.6.3. Análise dos dados

Na otimização da metodologia, as listas de picos produzidas foram utilizadas para enumeração do número de picos, critério de qualidade definido neste estudo. De notar que, apesar de nos espetros só serem apresentados os picos inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (*offset*: 0,015 mV; *response*: 1,200), para a análise foram considerados todos os picos detetados na análise. A normalização dos espetros otimizados foi realizada utilizando a ferramenta *Peak Processing*, disponível no sistema Axima LNR. As listas de picos foram processadas utilizando a plataforma disponível *on-line* SPECLUST (<http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html>) (Alm *et al.*, 2006). Nesta plataforma, foi avaliada a similaridade entre espetros produzidos por várias réplicas e foram determinados picos específicos para cada fração celular.

2.6.3.1. Análise da reprodutibilidade

A análise da reprodutibilidade foi realizada para os espectros gerados a partir da metodologia otimizada para a preparação de frações e foi realizada segundo o método descrito por Callesen *et al.* (2008), em que, a proporção entre o número de picos reprodutíveis e o número de picos perfeitamente reprodutíveis em cada conjunto de listas de picos é utilizada como uma medida de reprodutibilidade da metodologia desenvolvida. De forma a determinar o número de picos reprodutíveis e o número de picos perfeitamente reprodutíveis em listas de picos adquiridos durante a mesma experiência (intra-réplicas) e em experiências diferentes (inter-réplicas) foi utilizada a aplicação *Peaks in Common* da plataforma SEPCLUST. Esta aplicação permite a identificação de picos compartilhados por um conjunto de espectros de massa. Os parâmetros foram definidos de acordo com a análise realizada:

- *Análise intra-réplicas*: os valores de m/z encontrados em pelo menos 3 das 4 réplicas foram definidos como picos reprodutíveis e os valores m/z encontrados em 4 das 4 réplicas foram definidos como picos perfeitamente reprodutíveis. Os parâmetros de análise (Alm *et al.*, 2006) foram definidos como: distância de incerteza 1 Da; *Pairwise score cutoff*: 0,5; *Multiple score cutoff*: 0 e *Consensus cutoff*: 2.
- *Análise inter-réplicas*: de cada experiência independente foi gerada uma lista de picos correspondente à média do valor de m/z dos picos reprodutíveis. Os picos reprodutíveis foram definidos como os picos detetados em pelo menos 2 das 3 listas e os picos perfeitamente reprodutíveis foram definidos como os picos detetados em 3 das 3 listas. Os parâmetros de análise (Alm *et al.*, 2006) foram definidos como: (1) distância de incerteza, 1 Da; (2) *Pairwise score cutoff*, 0,5; (3) *Multiple score cutoff*, 0; e (4) *Consensus cutoff*, 1.

As listas de picos resultantes de cada análise foram utilizadas para a análise de *clustering* (item 2.6.3.2.).

2.6.3.2. Análise de *Clustering*

Análise de *clustering* para avaliar a similaridade entre listas de picos foi realizada na plataforma SPECLUST, como descrito por Böhme *et al.* (2010). Nesta análise foi utilizado o método de *clustering* hierárquico, no qual primeiramente cada lista de picos é atribuída a um *cluster* (N listas, representando N *clusters*). De seguida, foram calculadas as distâncias entre cada par de *clusters* e os pares mais próximos são fundidos num novo *cluster*. Este processo é repetido até existir apenas um *cluster*, contendo N listas, que é organizado num dendrograma. A escala do dendrograma representa a distância entre as listas de picos. Os parâmetros de análise (Alm *et al.*, 2006) utilizados foram: (1) métrica- a medida para calcular a distância entre cada lista de picos-, baseada em correlação; (2) ligação- a medida para calcular a distância entre cada grupo de listas de picos-, média; e (3) distância de incerteza, 1 Da.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Semiquantificação e identificação de microrganismos em cateteres de hemodiálise

A pesquisa de microrganismos presentes em cateteres de HD foi realizada no sentido de avaliar a densidade microbiana e os principais microrganismos presentes nos cateteres.

Neste estudo foram analisados dois cateteres de HD (Tabela 5). A análise de cada cateter incluiu o processamento, em separado dos segmentos do cateter disponibilizados, tendo sido avaliados no máximo, três segmentos: o *cuff*, o segmento proximal e a ponta (Figura 1). Na literatura estão descritos diferentes métodos para a recuperação de microrganismos de cateteres (item 1.2.1), tendo neste estudo sido utilizado o método recomendado pela *European Renal Best Practice* (Vanholder *et al.*, 2010)- o método de rolamento em placa (Maki *et al.*, 1977). Este método permite a recuperação dos microrganismos presentes na superfície extraluminal do cateter, que tem sido sugerida como a que apresenta maior densidade microbiana (*vs.* superfície intraluminal) (Kite *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 2012). Adicionalmente, este é um método rápido e simples para a recuperação e posterior semiquantificação da população microbiana presente em cateteres de HD.

Os resultados obtidos (Tabela 5) mostram que no cateter ID 226 foram isolados 37 UFCs no segmento proximal, 3 UFCs no *cuff* e na ponta não foram isolados microrganismos. No que respeita ao cateter ID 251, foram processados dois segmentos, nomeadamente, o *cuff* e a ponta, a partir dos quais não foram isolados microrganismos. Devido ao pequeno número de cateteres analisados, os resultados obtidos são apenas indicativos de maior densidade microbiana no segmento proximal do que na ponta do cateter, no caso de culturas positivas. De facto, o estudo de Koh *et al.* (2012), no qual foram analisados 289 cateteres, mostrou que a densidade microbiana é superior no segmento proximal em relação à ponta do cateter, sugerindo que a colonização ocorre preferencialmente a partir do segmento proximal, através da migração percutânea dos microrganismos da flora da pele (Figura 2A) até à ponta.

Os microrganismos recuperados dos segmentos colonizados foram identificados, numa primeira fase com base em meios seletivos e diferenciais (identificação presuntiva) e numa segunda fase através de análise MALDI-TOF MS (identificação definitiva), como *S. epidermidis* (Tabela 5). De facto, este microrganismo é o principal colonizador da flora da pele humana (Davis, 1996) e assim, facilmente tem acesso ao cateter através da sua migração percutânea

(Figura 2A) ou da contaminação do conector (Figura 2B). De igual modo, outros estudos mostraram que *S. epidermidis* é o principal microrganismo presente em cateteres de HD (Tabela 1).

Como é amplamente aceito, *S. epidermidis* possui a capacidade de aderir à superfície do cateter e formar biofilme (Mack *et al.*, 2007). A presença de biofilme em cateteres de HD foi observada em pacientes com evidências de infecção assim como, em pacientes sem infecção (Jones *et al.*, 2011; Ramanathan *et al.*, 2012), sugerindo que o biofilme pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de infecções.

Tabela 5: Densidade e identificação dos microrganismos isolados de cateteres de HD

ID	Segmento	UFCs	Identificação
226	<i>Cuff</i>	3	<i>S. epidermidis</i>
	Proximal	37	<i>S. epidermidis</i>
	Ponta	< LD	n.a.
251	<i>Cuff</i>	< LD	n.a.
	Ponta	< LD	n.a.

ID, identificação da amostra; LD, limite de detecção (1 UFC); n.a., não aplicável

3.2. Estudo de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* formados *in vitro*

Com o objetivo de investigar de uma forma mais compreensiva a contribuição de biofilmes de *S. epidermidis* para a colonização de cateteres de HD foi avaliada a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em dois grupos de isolados clínicos, nomeadamente, estirpes de *S. epidermidis* recuperadas de cateteres de HD no âmbito do projeto “*Insights into peritoneal dialysis catheter associated biofilms*”. Para uma abordagem inicial foi selecionada uma estirpe de *S. epidermidis* isolada em elevada densidade -HD20.2- e uma estirpe isolada em baixa densidade- HD16.3- de cateteres de HD provenientes da coleção de isolados clínicos recuperados no âmbito do projeto supracitado (**Anexo**).

3.2.1. Capacidade de formação de biofilme *in vitro*

A investigação da capacidade de formação de biofilme das estirpes HD20.2 e HD16.3 incluiu a determinação do número de células cultiváveis e a determinação da biomassa total. A determinação do número de células cultiváveis baseia-se na contagem de UFCs enquanto, a determinação da biomassa total (células e componentes da matriz extracelular) se baseia na medição da densidade ótica do violeta cristal eluído após coloração do biofilme (Stepanovic *et al.*, 2000).

Neste estudo observou-se que ambas as estirpes possuem capacidade de formação de biofilme. Note-se que, no entanto os biofilmes formados pela estirpe HD20.2 apresentam uma densidade celular ligeiramente superior ($P < 0.05$) (Figura 6) mas menor biomassa total ($P < 0.05$) (Figura 7) do que os da estirpe HD16.3. De facto, estes resultados evidenciam as diferentes características que podem ter os biofilmes produzidos por diferentes estirpes.

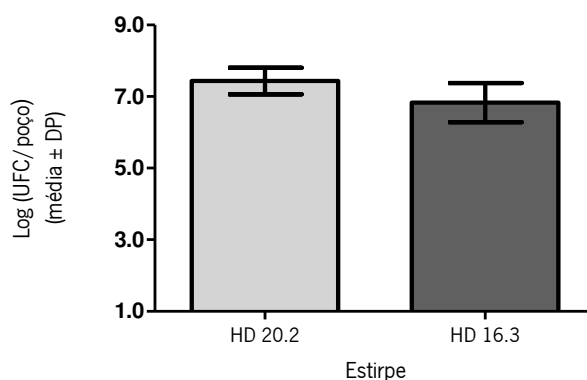


Figura 6: Número de células cultiváveis recuperadas a partir de biofilmes de *S. epidermidis*. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes, com oito réplicas dependentes, e as barras de erro representam o desvio padrão (DP) em relação à média. O controlo de remoção de biofilme (item 2.5.3.2.) mostrou que mais de 90% do biofilme foi removido com o método utilizado.

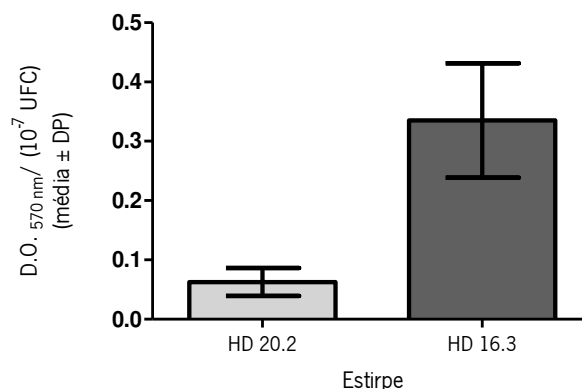


Figura 7: Biomassa de biofilme de *S. epidermidis*, expressa em função da D.O. 570 nm de violeta cristal/ 10⁻⁷ UFC. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes, com oito réplicas dependentes, e as barras de erro representam o DP em relação à média.

3.2.2. Células planctónicas

Adicionalmente à investigação da capacidade de formação de biofilme foi realizada a determinação do número de células planctónicas cultiváveis. Neste estudo, verificou-se que o número de células planctónicas cultiváveis é ligeiramente superior na estirpe recuperada em baixa densidade de cateteres (HD16.3) do que na estirpe recuperada em elevada de densidade (HD20.2) ($P < 0,05$) (Figura 8), contrariamente ao observado em biofilmes (Figura 7).

Em suma, para os isolados clínicos analisados no âmbito deste estudo observou-se que a estirpe *S. epidermidis* recuperada em elevada densidade em cateteres de HD apresenta maior número de células de biofilme no entanto, menor número de células planctónicas e menor teor em biomassa do que a estirpe recuperada em baixa densidade em cateteres de HD.

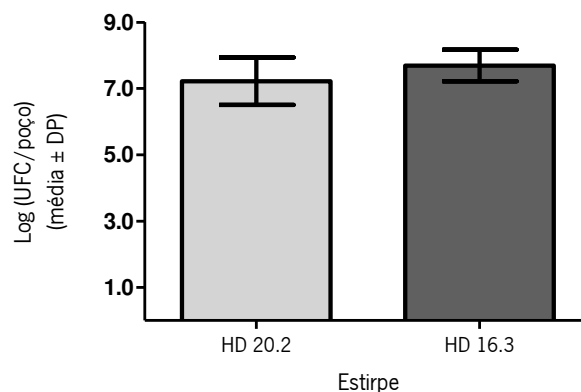


Figura 8: Número de células planctônicas cultiváveis de *S. epidermidis*. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes, com oito réplicas dependentes, e as barras de erro representam o DP em relação à média.

3.3. Investigação do perfil de MALDI-TOF MS de frações celulares e sobrenadantes de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* formados *in vitro*

A implementação da técnica de MALDI-TOF MS para o estudo de proteínas tem-se revelado uma estratégia promissora uma vez que permite uma análise rápida, fácil, com baixos custos associados e com elevado rendimento (Trauger, 2002). De entre as potenciais aplicações em microbiologia (Tabela 3), esta técnica permite traçar perfis para detecção de biomarcadores.

Em particular, as proteínas secretadas e as das células originárias do biofilme são alvos atrativos para a detecção de biomarcadores e o desenho de novas estratégias de monitorização e/ou terapia de infeções (Huxley-Jones *et al.*, 2008).

O conhecimento sobre proteínas que medeiam as diferentes fases de formação de biofilme de *S. epidermidis* é escasso (item 1.3.1.). No entanto, do que se conhece, as proteínas já descritas apresentam pesos moleculares superiores a 20 kDa (Tabela 2). Com exceção das PSMs (Tabela 2), pouco se conhece sobre proteínas de pesos moleculares mais baixos. Deste modo, o presente estudo teve por objetivo analisar o perfil de MALDI-TOF MS de sobrenadantes de biofilme e de frações celulares de biofilmes de *S. epidermidis* formados *in vitro*, na gama de m/z compreendida entre 700 e 7000. A otimização do método reporta à estirpe *S. epidermidis* HD20.2 (**Anexo**).

3.3.1. Otimização da metodologia

De acordo com a literatura a qualidade dos espectros obtidos por análise MALDI-TOF MS é afetada por vários parâmetros (revisto em Šedo *et al.*, 2011a), nomeadamente, a matriz (Madonna *et al.*, 2000), a concentração celular (Liu *et al.*, 2007) e os solventes utilizados para lavagem e/ou suspensão (Ruelle *et al.*, 2004). Logo, neste trabalho foi efetuada a otimização dos parâmetros pré-analíticos supracitados. No processo de otimização, como aplicado no estudo de Williams *et al.* (2003), o critério de qualidade do espectro obtido foi definido como o maior número de picos detetados.

No presente estudo foram analisadas separadamente duas gamas do espectro, especificamente, no intervalo m/z entre 700 e 3000 e entre 3000 e 7000. A estratificação do intervalo de valores m/z para otimização de metodologias com base na técnica de MALDI-TOF MS foi considerada num estudo anterior (Callesen *et al.*, 2008) para avaliar a reprodutibilidade em diferentes gamas do espectro.

3.3.1.1. Seleção da matriz e da quantidade de amostra

O estudo comparativo do efeito de diferentes matrizes e quantidades de amostra-proteína de sobrenadante/ número de células-, na qualidade do espectro obtido foi investigado em sobrenadantes de biofilme (item 3.3.1.a) e frações celulares (item 3.3.1.b) processadas no mesmo dia.

Das matrizes mais frequentemente utilizadas para análise MALDI-TOF MS (Tabela 4), foram selecionadas as matrizes CHCA e FA, uma vez que, segundo a literatura, são as mais adequadas para a análise de péptidos e proteínas com baixo peso molecular (entre 700 e 7000 Da). Em específico, a matriz CHCA, quando comparada com outras matrizes, permite a deteção de maior número de picos e com maior intensidade, em zonas do espectro mais baixas, correspondendo a péptidos e proteínas com pesos moleculares inferiores a 3000 Da (Ruelle *et al.*, 2004). Por outro lado, a matriz FA está associada ao estudo de proteínas com peso molecular entre 1500 e 15000 Da, permitindo a deteção de elevado número de picos e com grande reprodutibilidade (Kemptner *et al.*, 2009).

a) Sobrenadantes

Com o objetivo de estudar as proteínas secretadas por biofilmes de *S. epidermidis* formados *in vitro* foi realizada a otimização de um método de MALDI-TOF MS para análise de sobrenadantes. A quantidade de proteína de sobrenadante foi selecionada com base no estudo de Papac *et al.* (1998) em que foi mostrado que a quantidade mínima de proteína corresponde a 0,1 μg e a quantidade ótima a 1 μg . Assim, testou-se a quantidade de proteína no intervalo compreendido entre 0,1 e 2 μg com a matriz CHCA e FA (Figura 9).

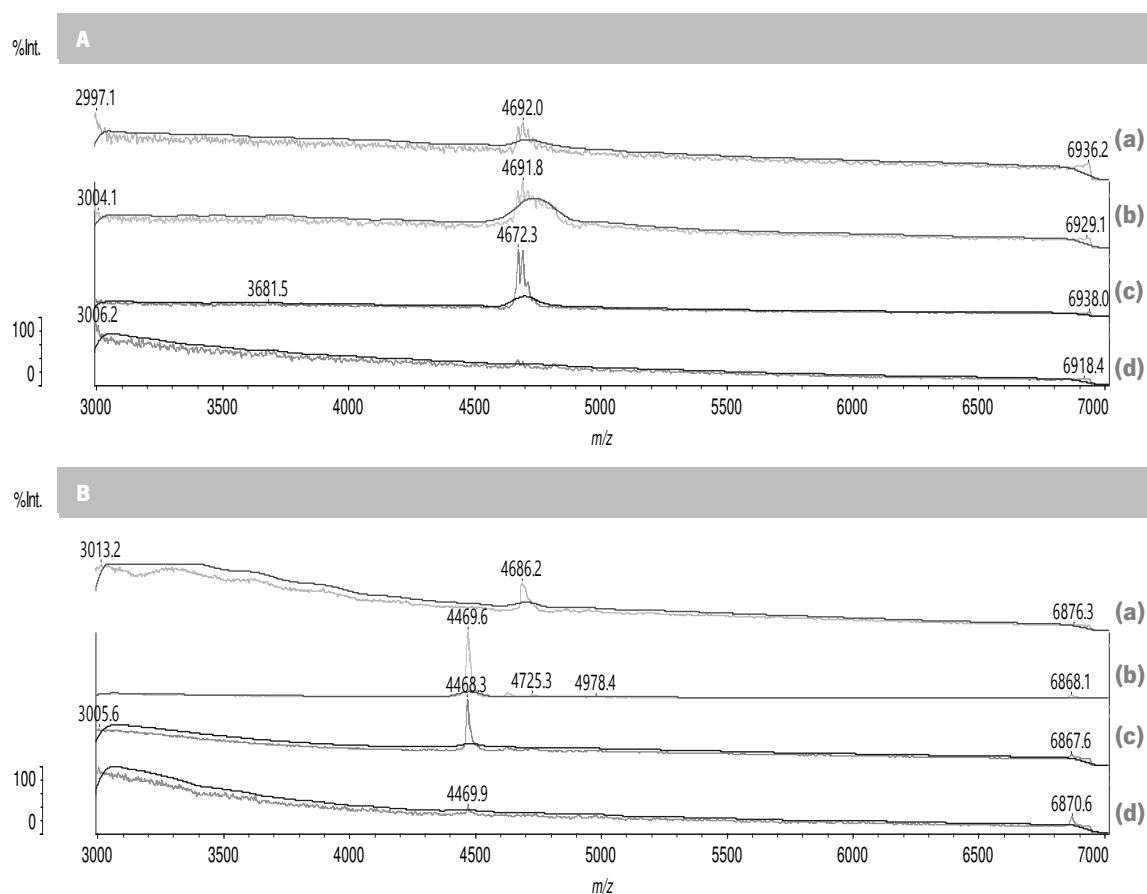


Figura 9: Espetros de MALDI-TOF MS obtidos para sobrenadantes de biofilme de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz **(A)** CHCA e **(B)** FA, utilizando diferentes quantidades de proteína: **(a)** 2, **(b)** 1, **(c)** 0,5 e **(d)** 0,1 μg . Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000.

Em todas as condições avaliadas os espectros obtidos utilizando a matriz CHCA possuem um reduzido número de picos (Figura 9A), em média, 10 picos detetados, inviabilizando a utilização da matriz CHCA devido à escassez de informação. De igual modo, os espectros de amostras analisadas com a matriz FA (Figura 9B) também possuem um limitado número de picos detetados, em média, 9 picos detetados. No entanto, para 1µg de proteína (Figura 9B.b), foi observado um número de picos ligeiramente superior (15 picos) em relação às restantes condições.

Estes resultados iniciais pareciam sugerir uma possível utilização de 1 µg de proteína de sobrenadante com a matriz FA. No entanto, com o decurso do trabalho experimental verificou-se que a qualidade da co-cristalização matriz/amostra é inconsistente (Figura 10), resultando em espectros com qualidade muito dispar, mesmo utilizando a mesma amostra. Isto pode ocorrer devido à contaminação das amostras, por exemplo pela presença de sais, que condicionam a qualidade dos resultados. Assim, não foi possível obter resultados consistentes com o presente método o que vem invalidar o objetivo de análise directa de sobrenadantes de biofilmes de *S. epidermidis* por MALDI-TOF MS. De notar que a análise do branco do sobrenadante mostrou que, nas condições experimentais testadas, se observaram problemas experimentais semelhantes aos observados com as amostras de sobrenadante (dados não mostrados).

As restantes matrizes frequentemente descritas (Tabela 4) são adequadas para análise de proteínas com peso molecular superior ao pretendido neste estudo. Logo, uma alternativa experimental poderia ser a introdução de uma etapa de fracionamento do sobrenadante, uma estratégia amplamente utilizada em estudos para análise de amostras complexas, como o soro. Por exemplo, Qiu *et al.* (2010) utilizou cromatografia de troca catiónica para fracionar e purificar péptidos e proteínas do soro facilitando assim a obtenção de perfis proteicos específicos.

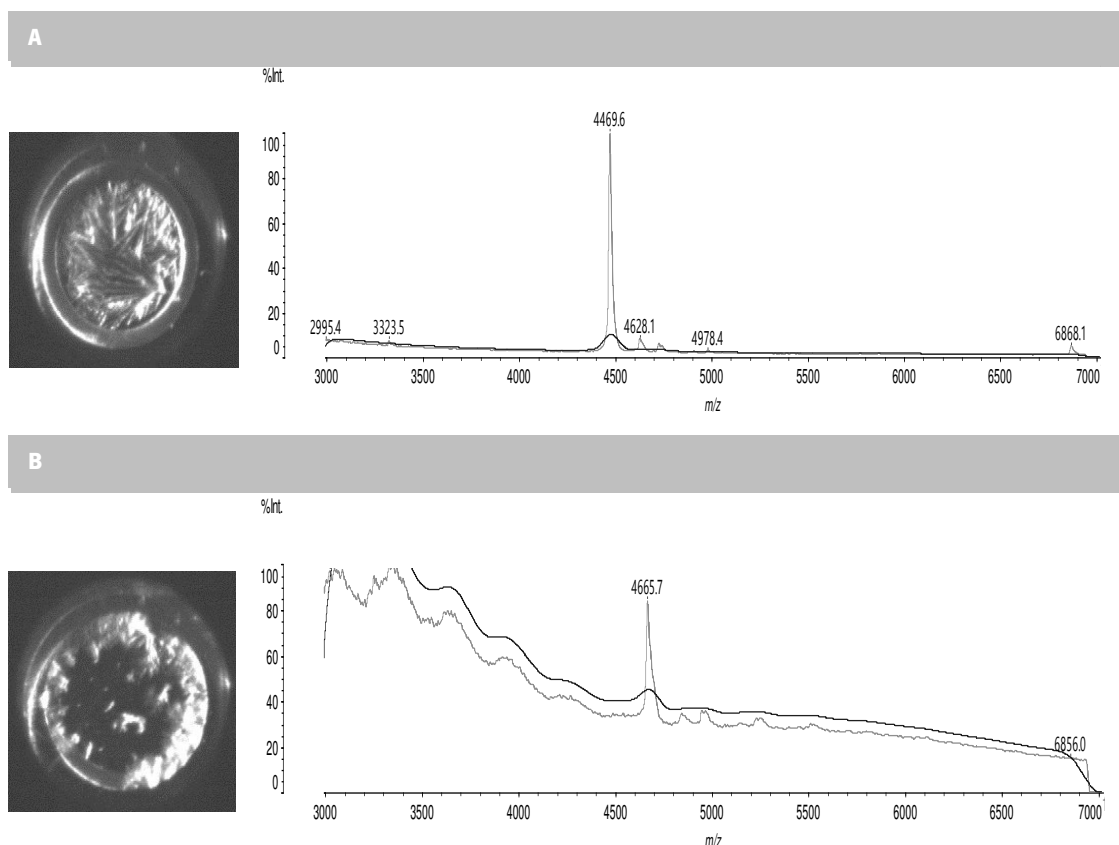


Figura 10: Imagens de duas posições da placa de MALDI-TOF MS e dos espectros correspondentes obtidos com uma mesma amostra de proteína obtida a partir de sobrenadante de biofilme de *S. epidermidis*. Exemplo de imagem de co-cristalização com elevada **(A)** e baixa **(B)** qualidade e espectro MALDI-TOF MS correspondente. Cada amostra foi analisada com a matriz FA e 1 µg de proteína. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000.

b) Frações celulares

Com o objetivo de estudar as proteínas de células de biofilme e planctônicas de *S. epidermidis* foi realizada a otimização de um método de MALDI-TOF MS para análise destas frações.

O estudo do efeito das matrizes CHCA e FA foi realizado para células de biofilme (Figura 11) e planctônicas (Figura 12). Observou-se que com a matriz CHCA são obtidos espectros com menor número picos do que com a matriz FA tanto para células do biofilme (Figura 11) como para células planctônicas (Figura 12) e independentemente do número de células utilizado. Em média, foram detetados 6 picos com a matriz CHCA *vs.* 34 picos com a matriz FA, para células de biofilme; e 7 picos com a matriz CHCA *vs.* 28 picos com a matriz FA para células planctônicas.

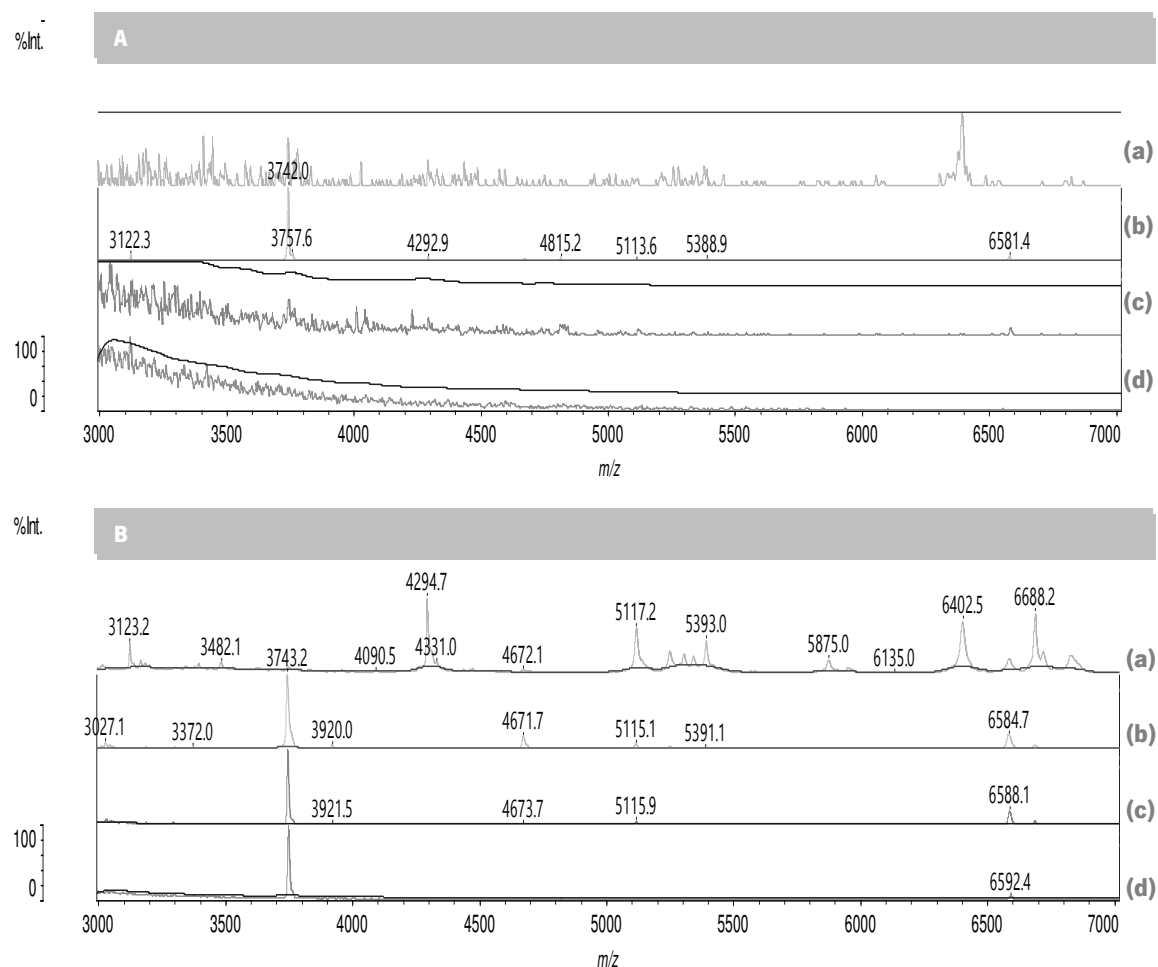


Figura 11: Espetros de MALDI-TOF MS obtidos para células intactas de biofilme de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz **(A)** CHCA e **(B)** FA utilizando diferentes números de células: **(a)** 6×10^8 , **(b)** 2×10^8 , **(c)** 2×10^7 e **(d)** 2×10^6 UFC/posição. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (*offset*: 0,015 mV; *response*: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000.

O número de células foi selecionado com base nas observações de Petersen *et al.* (2009) em que é sugerida a utilização de 10^6 UFC/posição para a análise MALDI-TOF MS de células bacterianas. Assim, testou-se entre 10^6 UFC/posição a 10^8 UFC/posição. Considerando os diferentes números de células avaliados para biofilme (Figura 11B) e células planctónicas (Figura 12B) processadas com a matriz FA, verificou-se que até 2×10^8 UFC/posição há aumento da qualidade do espectro, com um aumento do número de picos detetados, que se perde por aumento da quantidade de células. De facto, para 2×10^8 UFC/posição foram obtidos espectros com maior número de picos (66 picos).

Assim, células de biofilme (Figura 11) e planctónicas (Figura 12) processadas com a matriz FA originam espectros com maior número de picos do que com a matriz CHCA. Outros

estudos mostraram que amostras analisadas com a matriz CHCA produzem espectros com menor resolução de sinal (Nilsson, 1999) e detecção de menor número de picos (Madonna *et al.*, 2000) quando comparada com a matriz FA. No que respeita à quantidade de amostra, como evidenciado anteriormente (item 1.4.2.2.b) não há um procedimento padronizado para avaliação do efeito de diferentes quantidades de amostra e por conseguinte, inviabiliza a comparação com a literatura existente.

Em conclusão, destes ensaios foi selecionada a matriz FA e 2×10^8 UFC/posição para os ensaios seguintes.

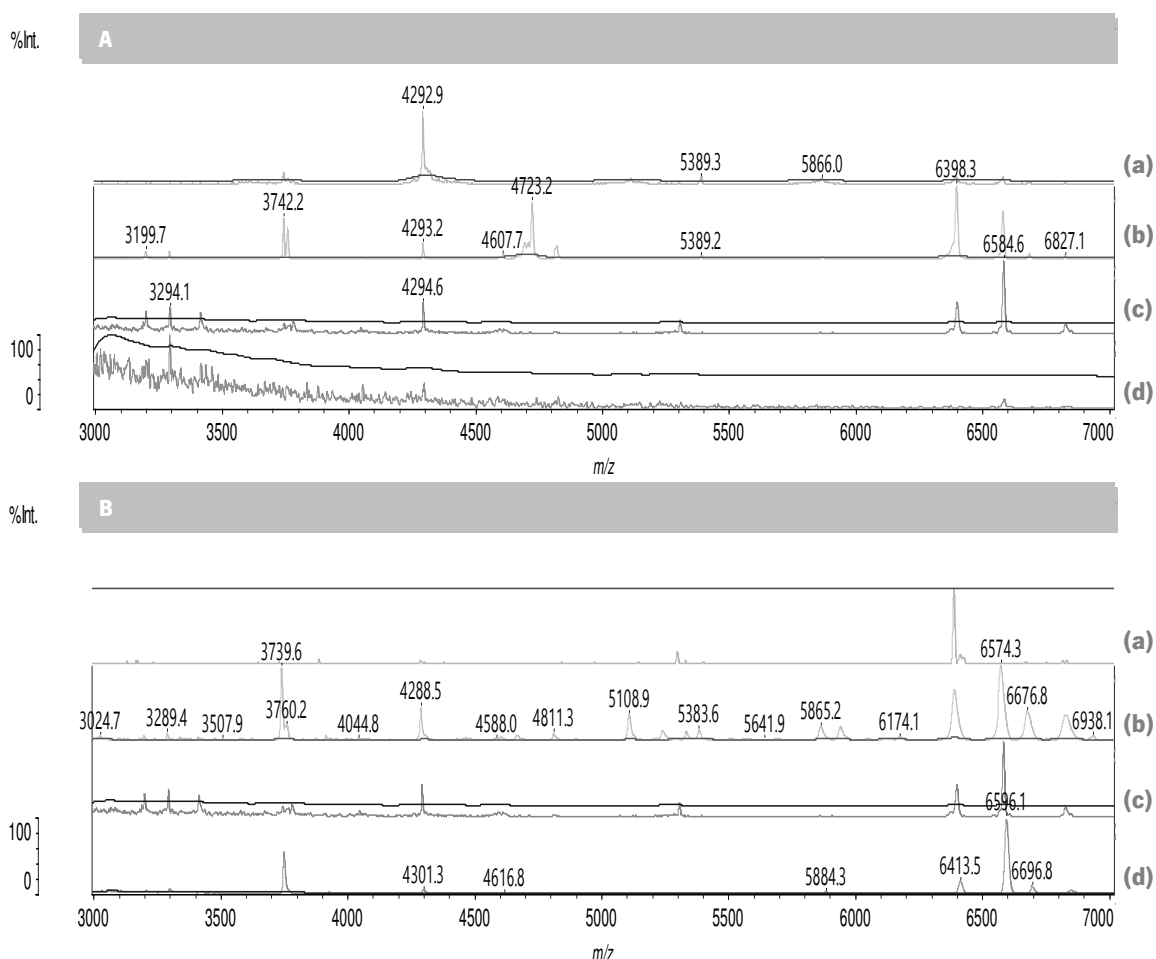


Figura 12: Espectros de MALDI-TOF MS obtidos para células planctónicas de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz **(A)** CHCA e **(B)** FA, com diferentes números de células: **(a)** 6×10^8 , **(b)** 2×10^8 , **(c)** 2×10^7 e **(d)** 2×10^6 UFC/posição. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; *response*: 1,200) Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000.

3.3.1.2. Preparação das frações celulares

O método de preparação da amostra tem sido reportado como um parâmetro com elevada influência na qualidade dos espectros MALDI-TOF MS (Wang *et al.*, 1998, Böhme *et al.*, 2010). Especificamente, Böhme *et al.* (2010) mostrou que os espectros de células intactas e de extratos bacterianos são muito similares, em termos do número de picos detetados embora os espectros obtidos a partir de extratos bacterianos apresentem maior reprodutibilidade e intensidade de sinal, relativamente aos obtidos a partir de células intactas. Estas vantagens parecem resultar da maior homogeneidade na distribuição da amostra na matriz. Por outro lado, De Bruyne *et al.* (2011) não observou um aumento significativo da qualidade dos espectros obtidos com extratos bacterianos em comparação com os obtidos com células intactas.

Desta forma, com base nos parâmetros anteriormente determinados (item 3.3.1.1.b), foi realizada a análise MALDI-TOF MS de extratos bacterianos (Figura 13), utilizando o método adaptado descrito por Wolters *et al.* (2011). No entanto, observou-se que nas condições utilizadas e independentemente da fração celular os espectros obtidos com extratos bacterianos (Figura 13) apresentam menor número de picos em comparação os obtidos para células intactas (Figuras 11 e 12). Especificamente em espectros obtidos com extratos bacterianos *vs.* células intactas foram detetados 7 picos *vs.* 66 picos (em células de biofilme) e 15 picos *vs.* 66 picos (em células planctónicas), respetivamente. Além disso, visualmente os espectros de extratos bacterianos de células de biofilme/ planctónicas (Figura 13) evidenciam maior ruído do que os espectros de células intactas (Figuras 11B.b e 12B.b).

Assim, a análise de células intactas originou espectros MALDI-TOF MS com maior qualidade (Figuras 11 e 12), o que aliado à simplicidade e rapidez de preparação da amostra em comparação com extratos bacterianos, levou a que esta abordagem fosse mantida nas etapas seguintes. Porém, é de notar que o conhecimento sobre o mecanismo a partir do qual são libertados os componentes intracelulares de células intactas é ainda muito escasso, tendo no entanto sido sugerido que pode ocorrer através de poros na parede celular (Madonna *et al.*, 2000) que se formam durante a preparação da amostra ou durante a ionização da amostra/matriz (Figura 4A) (Vaidyanathan *et al.*, 2002).

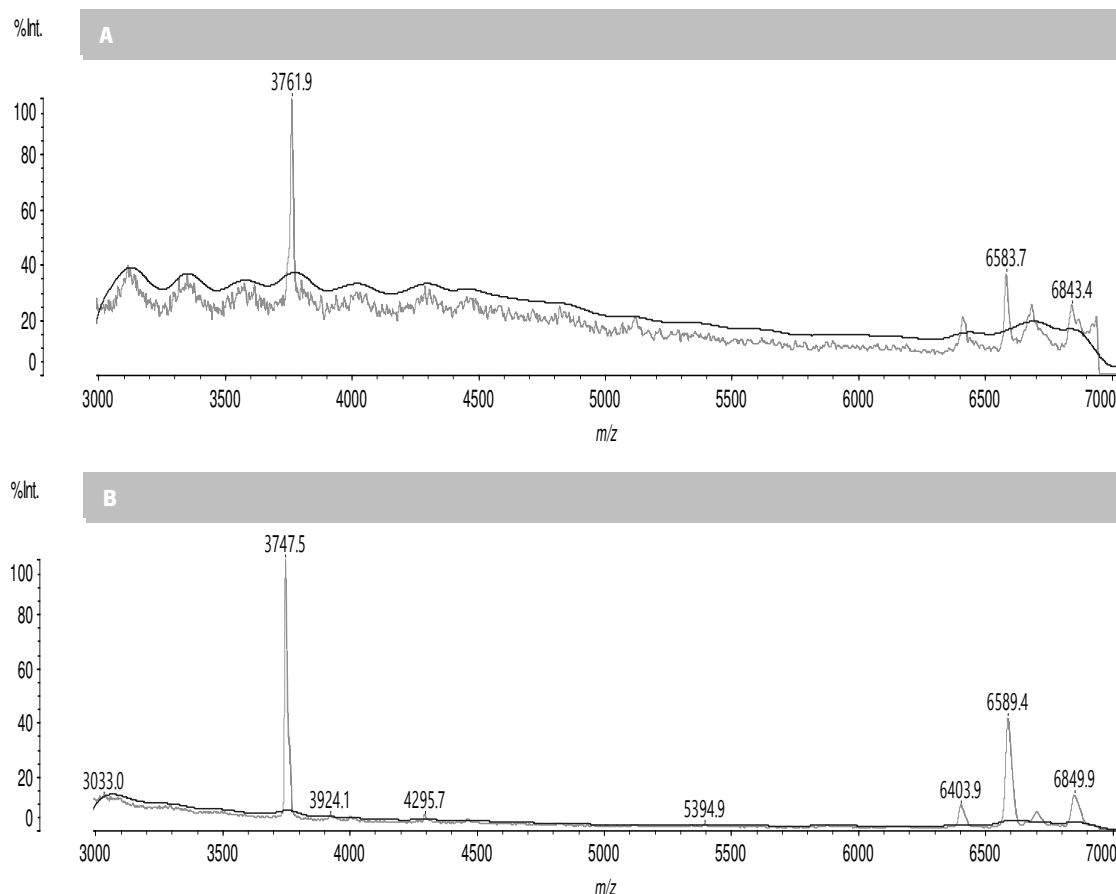


Figura 13: Espetros MALDI-TOF MS de extratos celulares de **(A)** biofilme e **(B)** planctônicas de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz FA com 2×10^8 UFC iniciais. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200) Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000. Contrapor com as Figuras 11 e 12.

3.3.1.3. Lavagem das frações celulares

O TFA é o solvente mais frequentemente utilizado para lavagem e/ou suspensão de culturas bacterianas para a análise MALDI-TOF MS (Krishnamurthy & Ross, 1996; Marvin-Guy *et al.*, 2004; Vanlaere *et al.*, 2008). No entanto, poucos estudos avaliaram a influência do TFA na qualidade dos espectros MALDI-TOF MS. Ainda assim, foi mostrado que os espectros de amostras tratadas com 0,1% TFA têm maior número de picos e com maior intensidade quando comparados com os obtidos com outros solventes (item 1.4.2.1.a) (Ruelle *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2007).

Assim, realizou-se a comparação de frações celulares tratadas e não tratadas com TFA de forma a averiguar o efeito deste procedimento na qualidade dos resultados. No entanto,

observou-se que nas condições utilizadas e independentemente da fração celular os espectros obtidos com células não lavadas com TFA (Figura 14) apresentam menor número de picos em comparação os obtidos para células lavadas com TFA (Figuras 11 e 12). Especificamente em espectros obtidos com células não lavadas *vs.* células lavadas foram detetados 54 picos *vs.* 66 picos (em células de biofilme) e 58 picos *vs.* 66 picos (em células planctônicas), respectivamente. Adicionalmente, a inspeção visual dos espectros revela que os relativos a células de biofilme (Figura 14A) e planctônicas (Figura 14B) não tratadas com 0,1% TFA têm maior ruído em comparação com os de células tratadas (Figuras 11B.b e 12B.b). Deste modo, é evidenciada a importância da lavagem com TFA no procedimento pré-analítico.

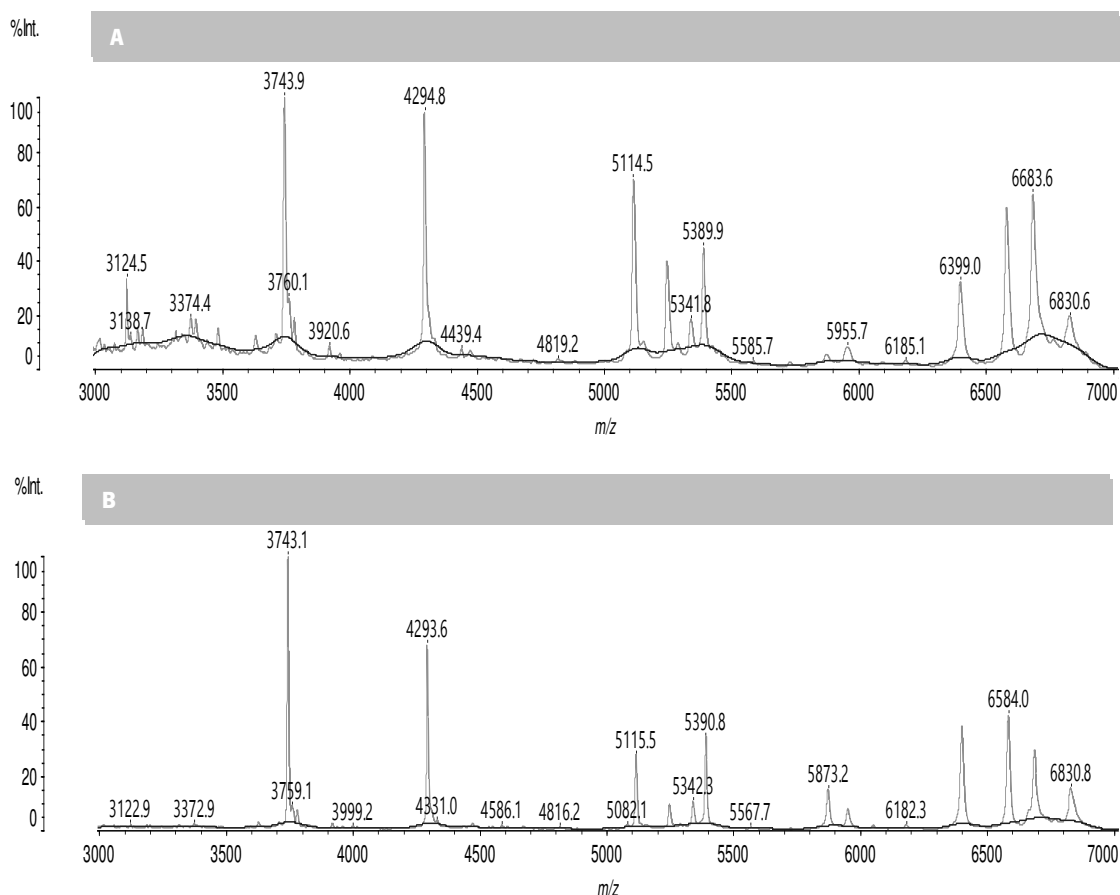


Figura 14: Espectros MALDI-TOF MS de células de **(A)** biofilme e **(B)** planctônicas não lavadas com TFA, de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz FA e com número de células correspondente a 2×10^8 UFC/posição. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (offset: 0,015 mV; response: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000. Contrapor com as Figuras 11 e 12.

Contudo, Vaidyanathan *et al.* (2002) mostrou que várias das proteínas detetadas em células intactas não lavadas também são detetadas no sobrenadante resultante da lavagem das mesmas células, sugerindo a perda de proteínas durante o processamento da amostra. Deste modo, neste estudo foi realizada a análise do espectro do sobrenadante resultante da lavagem da amostra. Como sugere a Figura 15 nestes espectros de MALDI-TOF MS não foram detetados picos. Por isso, este tratamento foi mantido e incluído no protocolo final.

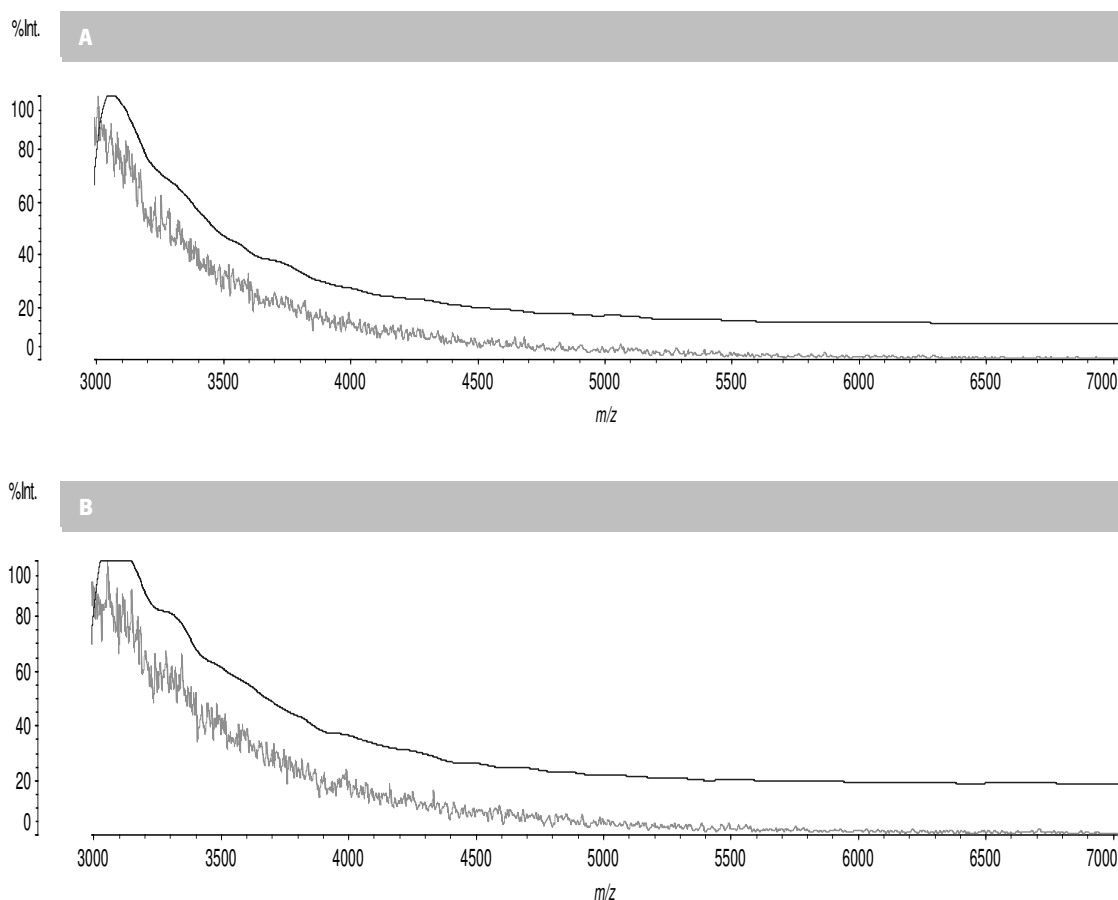


Figura 15: Espectros de MALDI-TOF MS do sobrenadante da resultante da lavagem com 0,1% de TFA de células de (A) biofilme e (B) planctônicas de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz FA. Intervalo m/z analisado entre 3000 e 7000.

3.3.2. Intervalo m/z entre 700 e 3000

Uma vez otimizada a metodologia para a análise MALDI-TOF MS de frações celulares foi avaliada a sua aplicabilidade no intervalo de valores m/z entre 700 e 3000 (Figura 16). O estudo de péptidos e proteínas em zonas mais baixas do espectro (até 1000 Da) está amplamente

descrito na literatura, devido à maior sensibilidade e reprodutibilidade da análise nesta zona do espectro (Callesen *et al.*, 2008).

Nesta análise verificou-se que com a metodologia aplicada, no intervalo m/z 700 a 3000 se obtêm espectros com elevada qualidade (Figura 16). Especificamente, foram detetados 109 picos em células de biofilme e 119 picos em células planctónicas.

Resumidamente, estes resultados validam a otimização da metodologia desenvolvida nomeadamente, 2×10^8 UFC/posição de células intactas recuperadas de biofilme de *S. epidermidis* lavadas com 0,1% TFA para a investigação de péptidos e proteínas com pesos moleculares compreendidos entre 700 e 7000 Da.

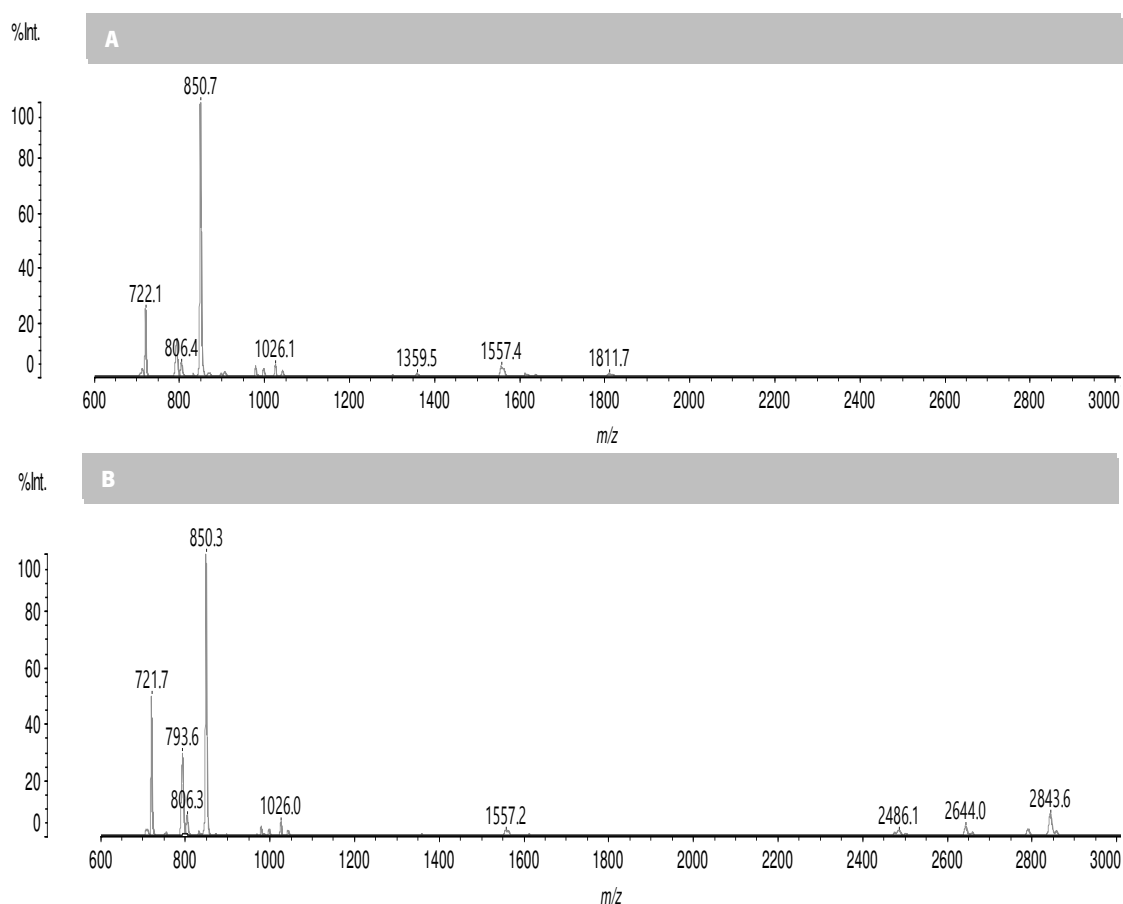


Figura 16: Espectros MALDI-TOF MS de células de **(A)** biofilme e **(B)** planctónicas de *S. epidermidis*. Cada amostra foi analisada com a matriz FA e com número de células correspondente a 2×10^8 UFC/posição. Os picos identificados no espectro são inferiores ao *Threshold Apex Peak Detection* (*offset*: 0,015 mV; *response*: 1,200). Intervalo m/z analisado entre 700 e 3000.

3.3.3. Recomendações experimentais

Relativamente à otimização da metodologia baseada na análise MALDI-TOF MS foi possível identificar vários fatores de natureza experimental que podem exercer grande influência sobre a qualidade do espectro MALDI-TOF MS, nomeadamente:

- As placas de MALDI-TOF MS usadas são reutilizáveis e por isso, deve ser assegurado que estão corretamente lavadas e secas. Recomenda-se o pré-teste da placa com solução de matriz.
- As etapas de lavagem com TFA devem ser efetuadas gentilmente de forma a garantir que não ocorre perda de células.
- A preparação da matriz deve ser realizada no próprio dia da análise. Durante o processamento da amostra a matriz deve ser mantida a 4°C e protegida da luz, para evitar a sua degradação.
- Os calibrantes, bradicinina e angiotensina II, devem ser armazenados a -20°C e a sua preparação deve ser realizada no próprio dia da utilização. O microrganismo de referência *E. coli* DH5 α , também utilizado para calibração, deve ser armazenado a 4°C por um período não superior a três semanas, para garantir a calibração eficiente.

Em suma, na literatura estão amplamente descritos diferentes parâmetros que influenciam a qualidade do espectro (Šedo *et al.*, 2011a) embora existam outros passos críticos que, apesar de frequentemente omitidos, podem influenciar a qualidade dos espectros.

3.3.4. Reprodutibilidade da metodologia otimizada

A reprodutibilidade é um dos principais desafios na implementação de uma metodologia de MALDI-TOF MS para traçar perfis proteicos (Albrethsen, 2007). Os perfis dos espectros devem gerar picos consistentes entre as réplicas, indicando que um espectro estável pode ser gerado a partir do protocolo otimizado (Liu *et al.*, 2007).

Uma vez demonstrada a aplicabilidade do método em ambas as gamas do espectro (item 3.3.2.) foi analisada a sua reprodutibilidade considerando o intervalo m/z entre 700 e 7000. A

partir de cada suspensão celular foram preparadas três réplicas independentes, cada uma com quatro réplicas dependentes perfazendo um total de 12 réplicas. Assim, foi avaliada a reprodutibilidade intra-réplicas (item 2.6.3.1.). Esta análise (Tabela 6) mostrou que a percentagem de picos perfeitamente reprodutíveis entre os picos reprodutíveis - média 57%- é elevada, em comparação com a descrita na literatura- média de 26%- (Callesen *et al.*, 2008). Estes resultados corroboram os observados na análise de *clustering* (Figura 17), onde se pode observar que dentro de cada experiência é possível discriminar entre células de biofilme e planctónicas, com exceção da experiência (i).

Tabela 6: Reprodutibilidade intra-réplicas. Picos perfeitamente reprodutíveis correspondem àqueles encontrados em quatro das quatro listas de picos geradas em cada experiência (i a iii). Picos reprodutíveis correspondem àqueles encontrados em pelo menos três das quatro listas de picos geradas em cada experiência (i a iii)

Células	Experiência	Número de picos perfeitamente reprodutíveis	Número de picos reprodutíveis	% Picos perfeitamente reprodutíveis relativamente aos picos reprodutíveis
Biofilme	I ^a	4	35	11,4
	II ^b	97	151	64,2
	III ^c	86	119	72,3
Planctónicas	I ^a	15	28	53,6
	II ^b	101	144	70,1
	III ^c	87	125	69,6

Número de picos total: ^a biofilme, 108 e planctónicas, 87; ^b biofilme, 197 e planctónicas, 197; ^c biofilme, 164 e planctónicas, 165.

No entanto, o maior desafio inerente à análise da reprodutibilidade de metodologias baseadas na técnica de MALDI-TOF MS consiste na análise da reprodutibilidade inter-réplicas (item 2.6.3.1). Assim, foi realizada uma análise da reprodutibilidade utilizando a lista média de picos reprodutíveis associados a cada experiência, perfazendo um total de três listas de picos para células de biofilme e planctónicas. Esta análise mostrou que, para células de biofilme dos 31 picos reprodutíveis, 9 são perfeitamente reprodutíveis; enquanto para células planctónicas dos 39 picos reprodutíveis, só 3 são perfeitamente reprodutíveis. De uma forma geral, para ambas frações celulares, a percentagem de picos perfeitamente reprodutíveis relativamente aos picos reprodutíveis é baixa, em média 18%.

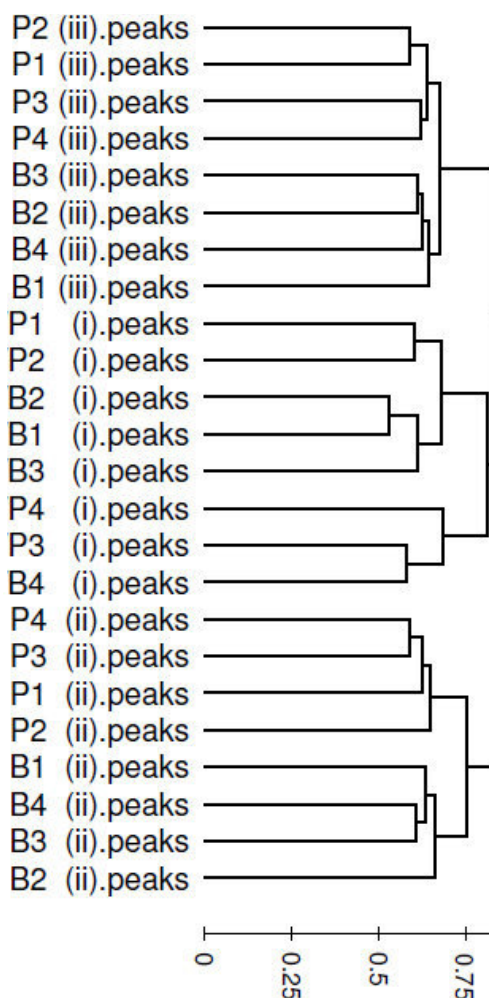


Figura 17: *Clustering* hierárquico das listas de picos geradas por MALDI-TOF MS, no intervalo de m/z entre 700 e 7000, de células de biofilme (**B**) e planctónicas (**P**) de *S. epidermidis*, relativo a três experiências (i a iii), cada uma com quatro réplicas (1 a 4). O dendrograma foi construído utilizando o *software* SPECLUST, os parâmetros métrica, distância de ligação e distância de similaridade foram definidos como correlação, média e 1 Da, respetivamente. A escala utilizada no dendrograma representa a distância entre cada lista de picos.

De facto, como ilustrado no dendrograma da Figura 18, não é possível observar distinção entre o perfil de m/z para células de biofilme e planctónicas obtido em diferentes experiências, evidenciando a falta de poder discriminatório da metodologia. A elevada variabilidade observada pode ser explicada pela variabilidade biológica da amostra, alterações de temperatura, humidade e pressão do laboratório que pode influenciar a co-cristalização e o tempo de preparação (Garbis *et al.*, 2005; West-Nørager *et al.*, 2007).

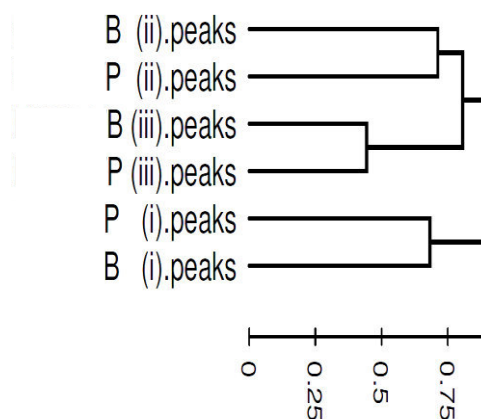


Figura 18: *Clustering* hierárquico das três listas geradas através da média das listas de picos encontrados em pelo menos três das quatro listas associadas a cada experiência, no intervalo de valores m/z entre 700 e 7000, de células de biofilme (**B**) e planctónicas (**P**), de *S. epidermidis*, relativo a três experiências (i a iii). O dendrograma foi construído utilizando o *software* SPECLUST, os parâmetros métrica, distância de ligação e distância de similaridade foram definidos como correlação, média e 1 Da, respetivamente. A escala utilizada no dendrograma representa a distância entre cada lista de picos.

Inicialmente pretendia-se estabelecer a comparação entre o perfil de isolados clínicos recuperados de cateteres de HD com diferentes densidades. Porém, nas condições experimentais utilizadas, não foi possível estabelecer um perfil MALDI-TOF MS único, reprodutível e distinto entre células de biofilme e planctónicas de *S. epidermidis*, por isso, não se considerou pertinente a realização da comparação inicialmente prevista.

No entanto, para a estirpe HD20.2, foi possível extrair picos específicos para cada fração celular (Tabela 7) a partir da lista de picos reprodutíveis inter-réplicas. Destes picos destacam-se aqueles que foram consistentemente observados em todas as experiências efetuadas: $m/z = 865$ $m/z = 992$ e 1036 para biofilme; $m/z = 2747$ para células planctónicas (Tabela 7).

Em suma, apesar de com a metodologia otimizada não ser possível estabelecer um perfil proteico único e reprodutível para células de biofilme e planctónicas, foram identificados picos característicos que podem corresponder a péptidos ou proteínas específicos de cada fração celular.

Tabela 7: Valores m/z específicos de células de biofilme e planctônicas de *S. epidermidis*

Biofilme	Planctônicas
<u>865</u>	731
961	864
972	889
978	1001
<u>992</u>	1199
<u>1036</u>	1331
1076	1438
1391	1452
1912	1707
2972	1869
3103	2147
6119	2377
	2476
	2545
	2644
	<u>2747</u>
	2793
	2845
	2861
	2932

Os valores m/z sublinhados correspondem a valores específicos de células de biofilme/ planctônicas perfeitamente reprodutíveis entre experiências independentes.

Capítulo 4

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

O principal objetivo do presente estudo consistiu no desenvolvimento de uma metodologia para a investigação do perfil proteico de sobrenadantes e frações celulares de biofilmes de *S. epidermidis* formados *in vitro* por MALDI-TOF MS. Adicionalmente, foi realizada a pesquisa da população microbiana em cateteres de HD e o estudo da capacidade de formação de biofilme *in vitro* de isolados clínicos. Sumariamente, deste trabalho conclui-se que:

- A pesquisa de microrganismos em cateteres de HD revelou que a presença de microrganismos não é universal a todos os cateteres, apesar de ter sido analisado um pequeno número de amostras;
- *S. epidermidis* está presente em cateteres de HD;
- Isolados clínicos de *S. epidermidis* recuperado de cateteres de HD com elevada e baixa densidade têm capacidade de formar de biofilme *in vitro*;
- A análise de sobrenadantes de biofilmes de *S. epidermidis* por MALDI-TOF MS requer uma etapa de otimização adicional;
- Para frações celulares as condições otimizadas correspondem a 2×10^8 UFC/posição de células intactas lavadas com 0,1% TFA processadas com a matriz FA, para valores de m/z entre 700 e 7000;
- A análise da reprodutibilidade intra-réplicas foi 57% e a inter-réplicas foi 18% para a metodologia otimizada;
- O perfil proteico obtido com a metodologia otimizada não possui poder discriminatório entre células de biofilme e planctónicas;
- A partir do perfil proteico obtido para células de biofilme e planctónicas é possível extrair picos específicos de cada fração celular;
- MALDI-TOF MS é um método rápido e viável para a identificação de microrganismos, mas para análise de sobrenadantes e células do biofilme de *S. epidermidis* não se revelou tão eficaz.

De seguida são apresentadas algumas sugestões para o desenvolvimento de futuros trabalhos de investigação, com base nos resultados obtidos neste estudo, nomeadamente:

- análise de maior número de estirpes recuperadas de cateteres com elevada e baixa densidade para melhor compreensão da contribuição de biofilme de *S. epidermidis* para a colonização de cateteres de HD;
- avaliação da integração de outras abordagens por exemplo, géis de eletroforese unidimensional ou espetrometria de massa acoplada a cromatografia líquida, para o estudo e deteção de biomarcadores específicos de sobrenadante e frações celulares de biofilmes de *S. epidermidis*;
- investigação de outras metodologias como por exemplo, espetrometria de massa com ionização por *electrospray* e aumentar o número de amostras para validar a especificidade dos picos.

Capítulo 5

REFERÊNCIAS

- Ahmad, A. et al.**, 2000. Trichloroacetic acid and trifluoroacetic acid-induced unfolding of cytochrome c: stabilization of a native-like folded intermediate. *Biochimica et biophysica acta*, 1480(1-2), pp.201–210.
- Albrethsen, J.**, 2007. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 53(5), pp.852–858.
- Allon, M.**, 2004. Dialysis catheter-related bacteremia: treatment and prophylaxis. *American journal of kidney diseases*, 44(5), pp.779–791.
- Alm, R. et al.**, 2006. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. *Journal of proteome research*, 5(4), pp.785–792.
- Arciola, C. et al.**, 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33(26), pp.5967–5982.
- Arrecubieta, C. et al.**, 2007. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *Journal of biological chemistry*, 282(26), pp.18767–18776.
- Banner, M. et al.**, 2007. Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *Journal of bacteriology*, 189(7), pp.2793–2804.
- Bantscheff, M. et al.**, 2012. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(4), pp.939–965.
- Beathard, G.**, 1999. Management of bacteremia associated with tunneled-cuffed hemodialysis catheters. *Journal of the american society of nephrology*, 10(5), pp.1045–1049.
- Besarab, A. et al.**, 2006. Clinical practice guidelines for hemodialysis adequacy. *American journal of kidney diseases*, 48(1), pp.S2-S90.
- Böhme, K. et al.**, 2010. Comparative analysis of protein extraction methods for the identification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical methods*, 2(12), p.1941-1947.
- Börnsen, K. et al.**, 1997. Influence of solvents and detergents on matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry measurements of proteins and oligonucleotides. *Rapid communications in mass spectrometry*, 11(6), pp.603–609.
- Bourcier, S. et al.**, 2001. Ionization of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix-assisted laser desorption ionization experiments and theoretical study. *International journal of mass spectrometry*, 210, pp.59–69.
- Bowden, M. et al.**, 2002. Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *Journal of biological chemistry*, 277(45), pp.43017–43023.

Briefel, G., 2006. Chronic kidney disease. Em N. Fiebach, L. Barker, J. Burton & P. Zieve (Eds) *Principles of Ambulatory Medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

De Bruyne, K. *et al.*, 2011. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and applied microbiology*, 34(1), pp.20–29.

Callesen, A. *et al.*, 2008. Reproducibility of serum protein profiling by systematic assessment using solid-phase extraction and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 22(3), pp.291–300.

Carbounelle, E. *et al.*, 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical biochemistry*, 44(1), pp.104–109.

Christner, M. *et al.*, 2010. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular microbiology*, 75(1), pp.187–207.

Cordwell, S. *et al.*, 1995. Cross-species identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption ionisation/time-of-flight mass spectrometry and amino acid composition. *Electrophoresis*, 16(3), pp.438–443.

Crnich, C. & Maki, D., 2002. The promise of novel technology for the prevention of intravascular device-related bloodstream infection. I. Pathogenesis and short-term devices. *Clinical infectious diseases*, 34(9), pp.1232–1242.

Croxatto, A. *et al.*, 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), pp.380–407.

Daugirdas, J., Blake, P. & Ing, T., 2000. *Handbook of Dialysis*. EUA, Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers.

Davis, C., 1996. Normal Flora. Em C., Davis (Ed.) *Medical Microbiology*. EUA, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston.

Donelli, G. *et al.*, 2001. A multicenter study on central venous catheter-associated infections in Italy. *Journal of chemotherapy*, 13(1), pp.251–262.

Donlan, R., 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerging infectious diseases*, 7(2), pp.277–281.

Donlan, R. & Costerton, J., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp.167–193.

Fenselau, C. & Demirev, P., 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 20(4), pp.157–171.

Flemming, H. & Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), pp.623–633.

- Fournier, R. et al.**, 2012. Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 18(3), pp.294–297.
- Fuchs, B. et al.**, 2010. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Progress in lipid research*, 49(4), pp.450–475.
- Garbis, S. et al.**, 2005. Limitations of current proteomics technologies. *Journal of chromatography A*, 1077(1), pp.1–18.
- Guembe, M. et al.**, 2012. How should long-term tunneled central venous catheters be managed in microbiology laboratories in order to provide an accurate diagnosis of colonization? *Journal of clinical microbiology*, 50(3), pp.1003–1007.
- Gunatillake, N., Jarvis, E. & Johnson, D.**, 2011. Hemodialysis Access Infections, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention. Em P., Maria (Ed.) *Technical Problems in Patients on Hemodialysis*, InTech.
- Harrison, J. et al.**, 2010. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nature protocols*, 5(7), pp.1236–1254.
- Heilmann, C. et al.**, 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Molecular microbiology*, 24(5), pp.1013–1024.
- Heilmann, C.**, 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 149(10), pp.2769–2778.
- Hrabák, J. et al.**, 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clinical microbiology reviews*, 26(1), pp.103–14.
- Hurst, G. et al.**, 1996. Detection of bacterial DNA polymerase chain reaction products by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 10(3), pp.377–382.
- Hussain, M. et al.**, 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infection and immunity*, 65(2), pp.519–524.
- Huxley-Jones, J. et al.**, 2008. Drug discovery in the extracellular matrix. *Drug discovery today*, 13(15), pp.685–694.
- Jaber, B.**, 2005. Bacterial infections in hemodialysis patients: pathogenesis and prevention. *Kidney international*, 67(6), pp.2508–2519.
- Jiang, L. et al.**, 2004. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of chromatography A*, 1023(2), pp.317–320.
- Johnson, E. et al.**, 2009. Affinity capture mass spectrometry of biomarker proteins using peptide ligands from biopanning. *Analytical chemistry*, 81(15), pp.5999–6005.

Jones, S. et al., 2011. Morphometric and biological characterization of biofilm in tunneled hemodialysis catheters. *American journal of kidney diseases*, 57(3), pp.449–55.

Kaplan, J. et al., 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *Journal of bacteriology*, 186(24), pp.8213–8220.

Kemptner, J. et al., 2009. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 23(6), pp.877–884.

Kirpekar, F. et al., 2000. Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry. *RNA*, 6(2), pp.296–306.

Kite, P. et al., 1997. Evaluation of a novel endoluminal brush method for in situ diagnosis of catheter related sepsis. *Journal of clinical pathology*, 50(4), pp.278–282.

Kloos, W. & Bannerman, T., 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(1), pp.117–140.

Koh, D. et al., 2012. Density of microbial colonization on external and internal surfaces of concurrently placed intravascular devices. *American journal of critical care*, 21(3), pp.162–171.

Kong, Y. et al., 2001. Ionization mechanism of oligonucleotides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 15(1), pp.57–64.

Krishnamurthy, T. & Ross, P., 1996. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid communications in mass spectrometry*, 10(15), pp.1992–1996.

Kwasny, S. & Opperman, T., 2010. Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Current protocols in pharmacology*, 50 (13A), pp 8.1-8.23

Lasa, I. & Penadés, J., 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology*, 157(2), pp.99–107.

Lay, J., 2002. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass spectrometry reviews*, 20(4), pp.172–194.

Li, Y. et al., 2005. Ionic-liquid matrices for improved analysis of phospholipids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the american society for mass spectrometry*, 16(5), pp.679–682.

Liu, H. et al., 2007. Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), pp.1899–1907.

- Longshaw, C. et al.**, 2000. Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. *Microbiology*, 146 (6) pp.1419–1427.
- Macário, F.**, 2012. “Observe, register, and communicate: the relevance of national registries”. Em Up-date Course on Peritoneal Dialysis 2012 [Conferência], Hotel das Artes, Porto, 4-6 Junho 2012.
- Mack, D. et al.**, 2007. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(2), pp.399–408.
- Madonna, A. et al.**, 2000. On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 14(23), pp.2220–2229.
- Maki, D. et al.**, 1977. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *New england journal of medicine*, 296(23), pp.1305–1309.
- Mann, M. et al.**, 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry*, 70, pp.437–473.
- Marvin-Guy, L. et al.**, 2004. Rapid identification of stress-related fingerprint from whole bacterial cells of *Bifidobacterium lactis* using matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of the american society for mass spectrometry*, 15(8), pp.1222–1227.
- Matthiesen, R. & Bunkenborg, J.**, 2013. Introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Methods in molecular biology*, 1007, pp.1–45.
- McCann, M. et al.**, 2008. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 60(12), pp.1551–1571.
- Mehlin, C. et al.**, 1999. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *Journal of experimental medicine*, 189(6), pp.907–918.
- Mermel, L. et al.**, 2001. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clinical infectious diseases*, 32(9), pp.1249–1272.
- Misra, R. et al.**, 2012. Developing an integrated proteo-genomic approach for the characterisation of biomarkers for the identification of *Bacillus anthracis*. *Journal of microbiological methods*, 88(2), pp.237–247.
- Moro, M. et al.**, 1994. Risk factors for central venous catheter-related infections in surgical and intensive care units. The central venous catheter-related infections study group. *Infection control and hospital epidemiology*, 15(4), pp.253–264.
- Nassar, G. & Ayus, J.**, 2001. Infectious complications of the hemodialysis access. *Kidney international*, 60(1), pp.1–13.

- Nilsson**, C., 1999. Fingerprinting of *Helicobacter pylori* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis. *Rapid communications in mass spectrometry*, 13(11), pp.1067–1071.
- Nilsson**, M. *et al.*, 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity*, 66(6), pp.2666–2673.
- Ohara-Nemoto**, Y. *et al.*, 2002. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*, 33(1), pp.33–41.
- Otto**, M., 2012. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in immunopathology*, 34(2), pp.201–214.
- Otto**, M., 2008. Staphylococcal biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*, 322, pp.207–228.
- Otto**, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* the “accidental” pathogen. *Nature reviews microbiology*, 7(8), pp.555–567.
- Papac**, D. *et al.*, 1998. A high-throughput microscale method to release N-linked oligosaccharides from glycoproteins for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis. *Glycobiology*, 8(5), pp.445–454.
- Pastan**, S. *et al.*, 2002. Vascular access and increased risk of death among hemodialysis patients. *Kidney international*, 62(2), pp.620–626.
- Perry**, S., 1998. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular biotechnology*, 9(1), pp.59–64.
- Petersen**, C. *et al.*, 2009. Characterization of microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Methods in molecular biology*, 492, pp.367–379.
- Pitt**, J. & Gorman, J., 1996. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of sialylated glycopeptides and proteins using 2,6 dihydroxyacetophenone as a matrix. *Rapid communications in mass spectrometry*, 10, pp.1786–1788.
- Powe**, N. *et al.*, 1999. Septicemia in dialysis patients: incidence, risk factors, and prognosis. *Kidney international*, 55(3), pp.1081–1090.
- Qin**, Z. *et al.*, 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153(7), pp.2083–2092.
- Qiu**, F. *et al.*, 2010. Serum proteomic profile analysis for endometrial carcinoma detection with MALDI-TOF MS. *Archives of medical science*, 6(2), pp.245–252.
- Rajalingam**, D. *et al.*, 2009. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein science*, 18(5), pp.980–993.

- Ramanathan, V. et al.**, 2012. Characteristics of biofilm on tunneled cuffed hemodialysis catheters in the presence and absence of clinical infection. *American journal of kidney diseases*, 60(6), pp.976–982.
- Ranganathan, S. & Garg, G.**, 2009. Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. *Genome medicine*, 1(11), pp.113.1-113.
- Ruelle, V. et al.**, 2004. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 18(18), pp.2013–2019.
- Sadovskaya, I. et al.**, 2005. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infection and immunity*, 73(5), pp.3007–3017.
- Saenz, A. et al.**, 1999. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. *Rapid communications in mass spectrometry*, 13(15), pp.1580–1585.
- Safdar, N., Fine, J. & Maki, D.**, 2005. Meta-analysis: methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. *Annals of internal medicine*, 142(6), pp.451–466.
- Santos, C. et al.**, 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 71(3), pp.304–308.
- Saxena, A. et al.**, 2005. Vascular access related infections in hemodialysis patients. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation*, 16(1), pp.46–71.
- Schwartz, S. et al.**, 2003. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *Journal of mass spectrometry*, 38(7), pp.699–708.
- Šedo, O. et al.**, 2011a. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass spectrometry reviews*, 30(3), pp.417–434.
- Šedo, O. et al.**, 2011b. Optimization of mass spectral features in MALDI-TOF MS profiling of *Acinetobacter* species. *Systematic and applied microbiology*, 34(1), pp.30–34.
- Shah, H. & Gharbia, S. (Eds.)**, 2010. *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*. Reino Unido, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Sherertz, R. et al.**, 1990. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 28(1), pp.76–82.
- Stepanovic, S. et al.**, 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), pp.175–179.

- Stöcklin, R. et al.**, 1997. A stable isotope dilution assay for the in vivo determination of insulin levels in humans by mass spectrometry. *Diabetes*, 46(1), pp.44–50.
- Teufel, P. & Götz, F.**, 1993. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*, 175(13), pp.4218–4224.
- Tormo, M. et al.**, 2005. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, 151(7), pp.2465–2475.
- Trauger, S.**, 2002. Peptide and protein analysis with mass spectrometry. *Spectroscopy*, 16, pp.15–28.
- U.S. Renal Data System**, 2013. USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. EUA, Maryland: *National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*.
- Vaidyanathan, S. et al.**, 2002. Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins. *Rapid communications in mass spectrometry*, 16(13), pp.1276–1286.
- Vanholder, R. et al.**, 2010. Diagnosis, prevention and treatment of haemodialysis catheter-related bloodstream infections (CRBSI): a position statement of European Renal Best Practice (ERBP). *Nephrology, dialysis, transplantation plus*, 3(3), pp.234–246.
- Vanlaere, E. et al.**, 2008. Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of microbiological methods*, 75(2), pp.279–286.
- Veenstra, G. et al.**, 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of bacteriology*, 178(2), pp.537–541.
- Vuong, C. & Otto, M.**, 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and infection*, 4(4), pp.481–489.
- Wang, Z. et al.**, 1998. Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 12(8), pp.456–464.
- Wenzel, T. et al.**, 2006. 2,5-Dihydroxyacetophenone: a matrix for highly sensitive matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of proteins using manual and automated preparation techniques. *Rapid communications in mass spectrometry*, 20(5), pp.785–789.
- West-Nørager, M. et al.**, 2007. Unravelling in vitro variables of major importance for the outcome of mass spectrometry-based serum proteomics. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 847(1), pp.30–37.
- Wilcox, T.**, 2009. Catheter-related bloodstream infections. *Seminars in Interventional Radiology*, 26(2), pp.139–143.

- Williams, R. et al.**, 2002. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and immunity*, 70(12), pp.6805–6810.
- Williams, T. et al.**, 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *Journal of the american society for mass spectrometry*, 14(4), pp.342–351.
- Wolters, M. et al.**, 2011. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International journal of medical microbiology*, 301(1), pp.64–68.
- Yan, Z. et al.**, 1999. Mass spectrometric determination of a novel modification of the N-terminus of histidine-tagged proteins expressed in bacteria. *Biochemical and biophysical research communications*, 259(2), pp.271–282.
- Yao, Y. et al.**, 2005. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *Journal of infectious diseases* 191(2), pp.289–298.
- Ziebandt, A. et al.**, 2010. Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. *Proteomics*, 10(8), pp.1634–1644.

Tabela: Densidade e identificação de microrganismos isolados de cateteres de HD no âmbito do projeto “*Insights into peritoneal dialysis catheter associated biofilms*” e utilizados no *Estudo de formação de biofilme* (3.2) e na *Investigação do perfil de MALDI-TOF MS* (3.3)

Estirpe	Segmento analisado	Método de recuperação	Densidade (UFC/segmento)	Identificação
HD20.2	Ponta	Sonicação	1×10^6	<i>S. epidermidis</i>
HD16.3	Ponta	Sonicação	<40	<i>S. epidermidis</i>